

Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/JP04/019750

International filing date: 24 December 2004 (24.12.2004)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: JP
Number: 2003-431408
Filing date: 25 December 2003 (25.12.2003)

Date of receipt at the International Bureau: 17 February 2005 (17.02.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse

24.12.2004

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日 2 0 0 3 年 1 2 月 2 5 日
Date of Application:

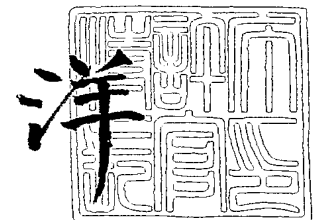
出 願 番 号 特 願 2 0 0 3 - 4 3 1 4 0 8
Application Number:
[ST. 10/C] : [J P 2 0 0 3 - 4 3 1 4 0 8]

出 願 人 麒麟麦酒株式会社
Applicant(s):

2 0 0 5 年 2 月 3 日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

小 川



【書類名】 特許願
【整理番号】 P03-1165
【提出日】 平成15年12月25日
【あて先】 特許庁長官 殿
【国際特許分類】 C07K 16/28
C12N 5/00
A61K 39/00
A61P 35/00

【発明者】
【住所又は居所】 群馬県高崎市宮原町 3 番地 麒麟麦酒株式会社 医薬探索研究所
内
【氏名】 高橋 信明

【発明者】
【住所又は居所】 群馬県高崎市宮原町 3 番地 麒麟麦酒株式会社 医薬開発研究所
内
【氏名】 三浦 徹

【発明者】
【住所又は居所】 群馬県高崎市宮原町 3 番地 麒麟麦酒株式会社 医薬探索研究所
内
【氏名】 北川 義康

【特許出願人】
【識別番号】 000253503
【氏名又は名称】 麒麟麦酒株式会社

【代理人】
【識別番号】 100091096
【弁理士】
【氏名又は名称】 平木 祐輔

【選任した代理人】
【識別番号】 100096183
【弁理士】
【氏名又は名称】 石井 貞次

【選任した代理人】
【識別番号】 100118773
【弁理士】
【氏名又は名称】 藤田 節

【選任した代理人】
【識別番号】 100111741
【弁理士】
【氏名又は名称】 田中 夏夫

【手数料の表示】
【予納台帳番号】 015244
【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】
【物件名】 特許請求の範囲 1
【物件名】 明細書 1
【物件名】 図面 1
【物件名】 要約書 1
【包括委任状番号】 0307451

【書類名】 特許請求の範囲**【請求項 1】**

少なくともヒンジ領域がヒトIgG2に由来するヒンジ領域であり、定常領域にADCCおよび／またはCDC活性の低減をもたらす1アミノ酸以上の変異および／または置換を含む、アゴニスティック抗CD40モノクローナル抗体の変異体。

【請求項 2】

少なくともアッパーヒンジおよびミドルヒンジ領域がヒトIgG2に由来するアッパーヒンジ領域およびミドルヒンジ領域であり、定常領域にADCCおよび／またはCDC活性の低減をもたらす1アミノ酸以上の変異および／または置換を含む、アゴニスティック抗CD40モノクローナル抗体の変異体。

【請求項 3】

上記ADCCおよび／またはCDC活性の低減をもたらす変異が、KabatらによるEUインデックスにより示される331位をセリンに置換したものである請求項1または2に記載のアゴニスティック抗CD40モノクローナル抗体の変異体。

【請求項 4】

定常領域がヒトIgG2に由来するものである請求項1から3のいずれか1項に記載のアゴニスティック抗CD40モノクローナル抗体の変異体。

【請求項 5】

アッパーヒンジおよびミドルヒンジ領域以外の定常領域が、ヒトIgG1に由来するものである請求項1から4のいずれか1項に記載のアゴニスティック抗CD40モノクローナル抗体の変異体。

【請求項 6】

ハイブリドーマKM341-1-19（受託番号FERM BP-7759）もしくは2105（受託番号FERM BP-8024）が産生するモノクローナル抗体の重鎖および軽鎖可変領域配列を含む請求項1から5のいずれか1項に記載のアゴニスティック抗CD40モノクローナル抗体の変異体。

【請求項 7】

定常領域にADCCおよび／またはCDC活性の低減をもたらす1以上の変異もしくは置換を含むアンタゴニスティック抗CD40抗体の変異体。

【請求項 8】

上記ADCCおよび／またはCDC活性の低減をもたらす変異もしくは置換が、サブクラスをヒトIgG4由来のものに置換するものである請求項7記載のアンタゴニスティック抗CD40抗体の変異体。

【請求項 9】

上記ADCCおよび／またはCDC活性の低減をもたらす変異もしくは置換が、定常領域のFc受容体との結合部位における置換である請求項7記載のアンタゴニスティック抗CD40抗体の変異体。

【請求項 10】

上記定常領域のFc受容体との結合部位における置換が、KabatらによるEUインデックスにより示される235位をグルタミン酸に置換したものである請求項9記載のアンタゴニスティック抗CD40抗体の変異体。

【請求項 11】

抗体重鎖間のSS結合の形成を促進させる変異をさらに含むものである、請求項7から10のいずれか1項に記載のアンタゴニスティック抗CD40抗体の変異体。

【請求項 12】

上記抗体重鎖間のSS結合の形成を促進させる変異がKabatらによるEUインデックスにより示される228位をプロリンに置換したものである請求項11記載のアンタゴニスティック抗CD40抗体の変異体。

【請求項 13】

定常領域が、ヒトIgG1に由来するものである請求項7から12のいずれか1項に記載のアンタゴニスティック抗CD40抗体の変異体。

【請求項 14】

ハイブリドーマ4D11（受託番号FERM BP-7758）の産生するモノクローナル抗体の重鎖および軽鎖可変領域を含む請求項 7 から 13 のいずれか 1 項に記載のアンタゴニスティック抗CD40抗体の変異体。

【請求項 15】

ハイブリドーマ4D11（受託番号FERM BP-7758）の産生するモノクローナル抗体の重鎖可変領域の38番目LのVへの置換、58番目PのRへの置換、62番目GのWへの置換、79番目IのMへの置換、81番目KのYへの置換、87番目HのYへの置換、98番目SのAへの置換、109番目KのRへの置換、120番目VのMへの置換、124番目TのAへの置換からなる群から選択される少なくとも一つの置換を含む請求項 14 記載のアンタゴニスティック抗CD40抗体の変異体。

【請求項 16】

4D11軽鎖可変領域の75番目NをSに置換した請求項 14 または 15 に記載のアンタゴニスティック抗CD40抗体の変異体。

【請求項 17】

請求項 1 から 16 のいずれか 1 項に記載の抗体を有効成分として含むADCCおよび／またはCDC活性が低減された医薬組成物。

【請求項 18】

免疫賦活剤、抗腫瘍剤または自己免疫疾患治療剤である、請求項 17 記載の医薬組成物

。

【請求項 19】

免疫抑制剤、自己免疫疾患治療剤、アレルギー治療剤または血液凝固第VIII因子阻害症候群治療剤である、請求項 17 記載の医薬組成物。

【書類名】明細書

【発明の名称】抗CD40抗体の変異体

【技術分野】

【0001】

本発明は免疫に関与する細胞膜分子であるCD40を認識する抗CD40抗体に関する。さらに本発明はアゴニスティック、アンタゴニスティック活性を保ちつつ、ADCC活性、CDC活性を低減するために、ヒト抗体定常領域に変異を導入した抗体、もしくはサブクラスの一部の構造を置換した抗体に関する。

【背景技術】

【0002】

1. CD40

CD40は分子量50kDaの細胞膜表面に存在する抗原であり、B細胞、樹状細胞（DC）、ある種の癌細胞、そして胸腺上皮細胞に発現している。CD40はB細胞やDCの増殖、分化に重要な働きをしていることが知られている。CD40は、ヒトB細胞表面に発現する抗原として同定され(E. A. Clark et. al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83: 4494, 1986, I. Stamenkovic et. al., EMBO J. 8:1403, 1989)、アミノ酸配列の相同性から、CD40は、低親和性NGFレセプターやTNFレセプター、CD27、OX40、CD30などが属しているTNFレセプターファミリーの1つのメンバーとして考えられている。ヒトおよびマウスのCD40に対するリガンド（CD40L）は、近年遺伝子クローニングされ、II型膜蛋白質であること、及び活性化したCD4+T細胞に発現していることが分かった。CD40Lは、強力な活性化シグナルをヒトおよびマウスのB細胞に導入することも分かっている。

【0003】

また、樹状細胞にはB細胞よりも多くのCD40発現が確認されており、重要な役割を担っていることが明らかとなってきた。CD40がCD40Lと結合すると、抗原提示細胞（APC）の活性化、すなわちCD80（B7-1）やCD86（B7-2）などの補助刺激分子の発現、あるいはIL-12の産生が増強される（Caux, C., et al.: Activation of human dendritic cells through CD40 cross-linking. J. Exp. Med., 180:1263, 1994）、（Shu, U., et al.: Activated T cells induce interleukin-12 production by monocyte via CD40-CD40 ligand interaction. Eur. J. Immunol., 25:1125, 1995）。樹状細胞は強い抗原提示能を有し、強力なヘルパーT（Th）細胞活性化能を持っている。また、ナイーブ（naive）Th細胞のTh1又はTh2細胞への分化を樹状細胞が制御していると考えられている。ミエロイド系樹状細胞である末梢血単球をGM-CSF及びIL-4とともに培養してCD40Lにより成熟させた樹状細胞（DC1）はin vitroにおいて、IL-12産生能を有し、異系naive Th細胞を刺激活性化し、IFN γ 産生T細胞を誘導する（すなわちTh1への分化を促す）。この作用は抗IL-12抗体により阻害されることから、IL-12を介した反応と考えられる。一方リンパ組織T領域や、末梢血に存在するplasmacytoid T細胞をIL-3、CD40リガンドとともに培養したリンパ球系樹状細胞（DC2）は、IL-12産生能は有さず、そして異系naive Th細胞を刺激活性化し、IL-4産生T細胞を誘導し、Th2への分化を促進することが示されている。Th1細胞は細胞性免疫の活性化にかかわり、Th2細胞は液性免疫能を高めると同時に細胞性免疫能の抑制に関与すると考えられている。Th1細胞のヘルプで活性化された細胞傷害性T細胞（CTL）は、細胞質内で増殖する病原体（多くのウイルス、リステリア菌、結核菌、およびトキソプラズマ原虫など）や腫瘍細胞を除去することができる。

【0004】

膜表面に発現したCD40を認識する抗CD40モノクローナル抗体が、B細胞に対していろいろな生物活性を示すことは示されてきた。抗CD40モノクローナル抗体は、CD40とCD40Lとの相互作用に対してアゴニスティックなものと、アンタゴニスティックなものとに大別される。

【0005】

2. アゴニスティック抗体

アゴニスティック抗体の作用として、B細胞の活性化が知られている。たとえば、抗CD4

0抗体が細胞接着を誘導する (Barrett et al., J. Immunol. 146: 1722, 1991; Gordon et al., J. Immunol. 140: 1425, 1988)、細胞の大きさを増進する (Gordon et al., J. Immunol. 140: 1425, 1988; Valle et al., Eur. J. Immunol. 19: 1463, 1989)、抗IgM抗体、抗CD20抗体またはphorbol esterのみで活性化されたB細胞の分裂を誘導する (Clark and Ledbetter, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83: 4494, 1986; Gordon et al., LEUCOCYTE TYPING III. A. J. McMichael ed. Oxford University Press. Oxford, p.426; Paulie et al., J. Immunol. 142: 590, 1989)、IL4存在下でB細胞の分裂を誘導する (Valle et al., Eur. J. Immunol. 19: 1463, 1989; Gordon et al., Eur. J. Immunol. 17: 1535, 1987)、IL-4刺激、T細胞除去培養細胞のIgE (Jabara et al., J. Exp. Med. 172: 1861, 1990; Gascan et al., J. Immunol. 147: 8, 1991)、IgG、IgM (Gascan et al., J. Immunol. 147: 8, 1991) の発現を誘導する、IL-4によるB細胞からの可溶性CD23/FcεRIIの分泌と (Gordon and Guy, Immunol. Today 8: 339, 1987; Cairns et al., Eur. J. Immunol. 18: 349, 1988) 細胞上の発現増強 (Challa A, Allergy, 54: 576, 1999) をする、IL-6の生産を促進する (Clark and Shu, J. Immunol. 145: 1400, 1990) ことが報告されている。さらには、CDw32+接着細胞存在下で、IL-4及び抗CD40抗体を添加することにより、ヒト初代培養B細胞から、B細胞クローンを樹立することや (Banchera et al., Science 241: 70, 1991)、胚中心の中心細胞のアポトーシスが、抗原レセプターの働きにかかわらず、CD40を介して阻害されること (Liu et al., Nature 342: 929, 1989) が報告されている。以上のようにCD40は、ヒトB細胞表面に発現する抗原として同定されたため、単離された抗体の多くは、主にヒトB細胞に対する増殖分化誘導機能、癌細胞における細胞死誘導活性を指標に評価されてきた (Katira, A. et. al., LEUKOCYTE TYPING V. S. F. Schlossman, et. al. eds. p.547. Oxford University Press. Oxford, W. C. Flansow et. al., LEUKOCYTE TYPING V. S. F. Schlossman, et. al. eds. p.555. Oxford University Press. Oxford, J. D. Pound et. al., International Immunology, 11: 11, 1999,)。

【0006】

抗CD40抗体がDCを成熟させることが示された (Z. H. Zhou et. al., Hybridoma, 18: 471, 1999)。さらに、抗原特異的CD8T細胞プライミングにおけるCD4T細胞の役割は、CD40-CD40Lシグナリングを介したDCの活性化にあることが報告され、抗CD40モノクローナル抗体 (mAb) により、樹状細胞 (DC) の活性化におけるCD4ヘルパーT細胞の役割を代替できることが示された (Shoenberger, S.P., et.al.: T-cell help for cytotoxic T lymphocytes is mediated by CD40-CD40L interactions. Nature, 480, 1998)。また、マウスにおいて抗CD40抗体の投与によりCD40を発現する腫瘍細胞のみならず非発現腫瘍細胞からも生体を防御可能であることが示された (French, R.R., et.al.: CD40 antibody evokes a cytotoxic T-cell response that eradicates lymphoma and bypasses T-cell help. Nature Medicine, 5, 1999)。

【0007】

上述した機能に基づき、アゴニスティック抗CD40抗体は、細菌、ウイルスなどの感染症の治療、癌の治療等に使用しうるものと考えられている。W002/088186には優れたアゴニスティック活性を有する抗CD40抗体が記載されている。当該アゴニスティック抗体の代表例としてKM341-1-19抗体および2105抗体が挙げられる。KM341-1-19抗体を産生するハイブリドーマKM341-1-19は2001年9月27日、2105抗体を産生するハイブリドーマ2105は2002年4月17日に、独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター (茨城県つくば市東1丁目1番地1中央第6) にブタペスト条約に基づき国際寄託されている。受託番号はFERM BP-7759 (KM341-1-19) およびFERM BP-8024 (2105) である。

【0008】

3. アンタゴニスティック抗体

一方、上記のように、CD40が免疫反応において重要な役割を担っていることから、CD40とそのリガンドの結合を阻害することで、臓器移植時の免疫抑制や自己免疫疾患の治療薬が開発できると期待される。Sawada-Haseらは、クローン病患者の末梢血中の単球ではCD40を強く発現する細胞の割合が上昇していることを報告している。しかしながら、CD40と

そのリガンドの結合を阻害する抗体については、まだ良く分かっていない。そのような阻害性抗体は、たとえば、CD40の機能解析や、CD40の活性化が必要な疾患の治療に有効である可能性がある。また、CD40リガンドに対する阻害抗体も、CD40とCD40リガンドとの結合が関与する疾患薬として有効である可能性が示されている。しかしながら、CD40Lは活性化した血小板に発現するという報告 (V. Henn et. al., Nature 391: 591, 1998) があるため、抗CD40L抗体を治療薬として使った場合、血栓を引き起こす危険性が存在することが報告されている (T. Kawai et. al., Nat. Med. 6: 114, 2000)。このような観点から、CD40とそのリガンドの結合を阻害する抗体治療薬としては、抗CD40L抗体よりも、むしろCD40に対する抗体の方が安全性に優れると期待できる。抗CD40抗体としてはCD40LのCD40への結合を抑制し、なおかつ、抗体自身がCD40を活性化しないことが必要とされる。

【0009】

上述した機能に基づき、アンタゴニスティック抗CD40抗体は、自己免疫疾患の治療、臓器、骨髄等の移植に際しての拒絶反応の抑制に使用しうるものと考えられている。W002/088186には優れたアンタゴニスティック活性を有する抗CD40抗体が記載されている。当該アンタゴニスティック抗体の代表例として4D11抗体が挙げられる。4D11抗体を産生するハイブリドーマ4D11は2001年9月27日に、独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター（茨城県つくば市東1丁目1番地1中央第6）にブタペスト条約に基づき国際寄託されている。受託番号はFERM BP-7758である。

【0010】

【特許文献1】W002/088186号公報

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0011】

本件発明は、W002/088186に開示された、治療効果が期待できる抗CD40抗体について、医薬品としての最適化の図られた変異体を作製することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0012】

本発明者らは、鋭意研究の結果、従来知られている抗CD40抗体に比して、より疾患への治療効果が高いと考えられる新規なアゴニスティック抗体、及びアンタゴニスティック抗体の変異体を作製することに成功し、本発明を完成した。本件発明における、抗CD40抗体の改変についての基本的な考えかたを下記に詳述する。

【発明の効果】

【0013】

実施例に示すように、定常領域に変異を導入した本発明の抗CD40抗体およびサブクラスの一部の構造を他のサブクラスのものに置換した抗CD40抗体は、その活性を保持しつつ、ADCC活性およびCDC活性が低減されている。従って、本発明の抗体を治療用抗体として被験体に投与した場合、CD40発現細胞に対する細胞障害活性が弱く、安全に用いることができる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0014】

1. アゴニスティック抗体の改変

抗体は本来外来の微生物、ウイルスや癌に対する生体防御機能をつかさどる分子であるため、抗体が結合した細胞を殺傷し、取り除く作用を兼ね備えている。この殺傷機能は2種類あり、抗体依存性細胞性細胞傷害活性 (Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity。以下、ADCCと略記)、及び補体依存性細胞傷害活性 (Complement-Dependent Cytotoxicity。以下、CDCと略記) といわれている。

【0015】

ADCCは、Macrophage, NK細胞、好中球などの表面に発現しているFc Receptorを介して、抗体の定常領域と結合することにより細胞を認識し、認識した細胞が活性化することにより誘導される、細胞障害活性のことを言う。一方、CDCは抗体が抗原と結合することに

よって、活性化された補体系によって引き起こされる細胞障害活性のことを言う。これらの活性は、抗体のサブクラスによって、その活性の強弱が異なることが解っており、それは、抗体の定常領域の構造の違いに起因することがわかっている (Charles A. Janeway et al. *Immunobiology*, 1997, Current Biology Ltd/Garland Publishing Inc.)。

【0016】

抗CD40アゴニスティック抗体は、免疫活性化という作用メカニズムからADCC, CDCといった、CD40発現細胞の細胞死を引き起こす活性を持たないものが、治療薬としてより好ましいと考えられる。もしも、ADCC, CDC活性によってCD40発現細胞が障害を受けてしまった場合、期待する免疫活性化とは反対の免疫抑制状態になる可能性が考えられ、疾患の増悪をもたらす可能性が考えられる。また、感染症の治療薬として使用する場合、もともと患者のCDC, ADCC活性が亢進している可能性が考えられ、正常のヒト血清や、末梢血を用いた場合、その活性が検出できなかったとしても、より強い活性を持つウサギ補体などを用いて安全性に関して、より慎重に評価する必要がある。そのため、ADCC, CDC活性を持たない変異体や、組換え体を作製しその活性を調べた。

【0017】

ADCC, CDC活性は、抗体のサブクラスによって活性が異なることが知られているため、ADCC, CDC活性の低減はサブクラスの変換によって可能であると考えられる。たとえば、一般的にヒトIgGサブクラスの中で、IgG4はADCC, CDC活性が低いサブクラスとして知られており、IgG2はCDC活性はあるが、ADCC活性は低く、IgG1はADCC, CDC活性の両方とも高いことが報告されている (Charles A. Janeway et al. *Immunobiology*, 1997, Current Biology Ltd/Garland Publishing Inc.)。この特徴を生かし、特定のサブクラスを選択することにより細胞障害活性の少ない抗体にすることができる。また、特定のサブクラスの抗体と以下に示す点変異の組み合わせによって、目的の活性をもつ抗体を作ることができる。また、ADCC, CDC活性を低減させる方法としては、抗体定常領域に変異を導入することによって可能であることが報告されている。たとえば、L235, D265, D270, K322, P331, P329 (アルファベットはアミノ酸の一字表記。数字はKabatらによるEUインデックス (Kabat et al., *Sequences of proteins of Immunological Interest*, 1991 Fifth edition) を示す。以下同様。) は、ヒトIgGの補体活性化能に重要な役割を果たしていると考えられており、この部位を他のアミノ酸に置換することによって、CDC活性を低減できる (Esohe E. Idusogie et al. *J. Immunol.* 2000, 164:4178-4184, Yuanyuan Xu et al. *J. Biol. Chem.* 1994, 269:3469-3474, Brekke, O.H. et al. *Eur. J. Immunol.* 1994, 24:2542, Morgan, A., et al., *Immunology* 1995, 86:319, Lund, J., et al., *J. Immunol.*, 1996, 157:4963, Tao, M. H., et al., *J. Exp. Med.* 1993, 178:661)。具体的には、D270, K322, P329, P331をAに置換することにより可能である。また、P331をSやGに変換することによっても可能である。

【0018】

また、233-239, Gly316-Lys338, Lys274-Arg301, Tyr407-Arg416, Asn297, Glu318, Leu234-Ser239, Asp265-Glu269, Asn297-Thr299, Ala327-Ile332, はIgGとFcRの結合に関与していると考えられており (Duncan, A. R., Woof, J. M., Partridge, L. J., Burton, D. R., and Winter, G. (1988) *Nature* 332, 563-564, Gessner, J. E., Heiken, H., Tamm, A., and Schmidt, R. E. (1998) *Ann. Hematol.* 76, 231-248, Gavin, A., Hulet, M., and Hogarth, P. M. (1998) in *The Immunoglobulin Receptors and Their Physiological and Pathological Roles in Immunity* (van de Winkel, J.G.J., and Hogarth, P. M., eds), pp. 11-35, Kluwer Academic Publishers Group, Dordrecht, The Netherlands, Sautes, C. (1997) in *Cell-mediated Effects of Immunoglobulins* (Fridman, W. H., and Sautes, C., eds), pp. 29-66, R. G. Landes Co., Austin, TX, Da'ron, M. (1997) *Annu. Rev. Immunol.* 15, 203-234, Canfield, S. M., and Morrison, S. L. (1991) *J. Exp. Med.* 173, 1483-1491, Chappel, M. S., Isenman, D. E., Everett, M., Xu, Y.-Y., Dorrington, K. J., and Klein, M. H. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88, 9036-9040, Woof, J. M., Partridge, L. J., Jefferis, R., and Burton, D. R.

(1986) Mol. Immunol. 23, 319-330, Wines, B. D., Powell, M. S., Parren, P. W.H.I., Barnes, N., and Hogarth, P. M. (2000) J. Immunol. 164, 5313-5318)、この領域に変異を導入することにより、ADCC活性の低減が可能であると考えられる。具体的にはL235をE、G237をAに置換することにより、FcRとの結合能を低減させることは可能である。

【0019】

一部の抗CD40抗体に関しては、強力なアゴニスト活性の発現に関してIgG2のヒンジ領域が重要であることが、本発明において示された。したがって、可変領域と、ヒンジ領域以外の定常領域を任意のサブクラスに置換することや、点変異を導入することによって、ADCC、CDC活性の調整のみならず、抗体の生産性の向上、精製および保存時における安定性、血中動態の向上が期待できる。

【0020】

抗体医薬の生産においては、抗体の精製および保存時の安定性は非常に重要なポイントとなる。いままで開発されている抗体はIgG1サブクラスが最も多いため、上述の抗CD40アゴニスト抗体の物性をより向上させるためには、可変領域とヒンジ領域以外はIgG1サブクラス由来の配列とすることも有効であろう。

【0021】

本件発明は、以下のアゴニスティック抗CD40抗体変異体を提供する。

(1) 少なくともヒンジ領域がヒトIgG2に由来するヒンジ領域であり、定常領域にADCCおよび/またはCDC活性の低減をもたらす1アミノ酸以上の変異および/または置換を含む、アゴニスティック抗CD40モノクローナル抗体の変異体。

(2) 少なくともアッパーヒンジおよびミドルヒンジ領域がヒトIgG2に由来するアッパーヒンジ領域およびミドルヒンジ領域であり、定常領域にADCCおよび/またはCDC活性の低減をもたらす1アミノ酸以上の変異および/または置換を含む、アゴニスティック抗CD40モノクローナル抗体の変異体。

(3) 上記ADCCおよび/またはCDC活性の低減をもたらす変異が、KabatらによるEUインデックスにより示される331位をセリンに置換したものである上記(1)または(2)のアゴニスティック抗CD40モノクローナル抗体の変異体。

(4) 定常領域がヒトIgG2に由来するものである上記(1)から(3)のいずれかのアゴニスティック抗CD40モノクローナル抗体の変異体。

(5) アッパーヒンジおよびミドルヒンジ領域以外の定常領域が、ヒトIgG1に由来するものである上記(1)から(4)のいずれかのアゴニスティック抗CD40モノクローナル抗体の変異体。

(6) ハイブリドーマKM341-1-19(受託番号FERM BP-7759)もしくは2105(受託番号FERM BP-8024)が産生するモノクローナル抗体の重鎖および軽鎖可変領域配列を含む上記(1)から(5)のいずれかのアゴニスティック抗CD40モノクローナル抗体の変異体。

(7) また、本件発明は、ヒトIgG2に属するアゴニスト抗CD40抗体に改変を加えた抗体であって、アッパーヒンジおよびミドルヒンジ領域以外の定常領域が他のサブクラス由来の配列に置換された変異体を提供する。好ましい他のサブクラスはIgG1である。また、本件発明は、ヒトIgG2に属するアゴニスト抗CD40抗体に改変を加えた抗体であって、ヒンジ領域以外の定常領域が他のサブクラス由来の配列に置換された変異体を提供する。好ましい他のサブクラスはIgG1である。

【0022】

ここで、ADCC活性およびCDC活性が低下しているとは、上記変異体でない、抗CD40モノクローナル抗体に比べて、ADCC活性およびCDCが低下していることをいい、例えば、ハイブリドーマKM341-1-19(受託番号FERM BP-7759)もしくは2105(受託番号FERM BP-8024)が産生するモノクローナル抗体に比べてADCC活性およびCDCが低下していることをいう。ADCC活性およびCDC活性は公知の方法により測定することができ、例えば本明細書の実施例に記載の方法で測定すればよい。ハイブリドーマKM341-1-19(受託番号FERM BP-7759)もしくは2105(受託番号FERM BP-8024)が産生するモノクローナル抗体の重鎖および軽鎖可変領域配列は以下に示すとおりである。

【0023】

341-1-19 のH鎖全長、及びL鎖可変領域をコードするDNA並びにH鎖及びL鎖のアミノ酸配列をそれぞれ以下に示す。

【0024】

H鎖DNAの翻訳開始点は、配列番号37の5'末端から50番目のアデニン (A) からはじまるATGコドンであり、終止コドンは1472番目のチミン (T) からはじまるTGAである。抗体可変領域と定常領域の境界は5'末端から493番目のアデニン (A) と494番目のグアニン (G) 間に位置する。アミノ酸配列において、H鎖可変領域は配列番号38のN末端から148番目のセリン (S) 残基までであり、149番目のアラニン (A) 以降が定常領域である。遺伝子配列予測ソフトウェア (Signal P ver.2) により、H鎖のシグナル配列は配列番号38のN末端より20番目のセリン (S) までと予測された。成熟体のN末端は配列番号38の21番目のグルタミン (Q) であるものと考えられる。

【0025】

L鎖DNAの翻訳開始点は、配列番号39の5'末端から29番目のAからはじまるATGコドンであり、可変領域は5'末端から400番目のアデニン (A) までである。アミノ酸配列において、可変領域は配列番号40のN末端から124番目のリジン (K) までである。精製されたL鎖蛋白質のN末端分析により、L鎖のシグナル配列は配列番号40のN末端より20番目のグリシン (G) までであり、成熟体のN末端は配列番号40の21番目のグルタミン酸 (E) であることが明らかとなった。

【0026】

341-1-19 H鎖 (配列番号37) :

```
GTCGACGCTGAATTCTGGCTGACCAGGGCAGCCACCAGAGCTCCAGACAATGTCTGTCTCCTTCCTCATCTTCCTGCCCCG
TGCTGGGCCTCCCATGGGGTGTCTGTACAGGTCCAAGTGCAGCAGTCAGGTCCAGGACTGGTGAAGCCCTCGCAGACC
CTCTCACTCACCTGTGCCATCTCCGGGGACAGTGTCTCTAGCAACAGTGCTACTTGGAACTGGATCAGGCAGTCCCCATC
GAGAGACCTTGAGTGGCTGGGAAGGACATACTACAGGTCCAAGTGGTATCGTGATTATGTAGGATCTGTGAAAAGTCGAA
TAATCATCAACCCAGACACATCCAACAACAGTTCTCCCTGCAGCTGAACTCTGTGACTCCCCGAGGACACGGCTATATAT
TACTGTACAAGAGCACAGTGGCTGGGAGGGGATTACCCCTACTACTACAGTATGGACGCTCTGGGGCCAAGGGACCACGGT
CACCGTCTCTTCAGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCGCCCTGCTCCAGGAGCACCTCCGAGAGCACAG
CGGCCCTGGGTGCTCGTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGGAAGTCAAGGCGCTCTGACCAGCGGC
GTGCACACCTTCCCAGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAACTT
CGGCACCCAGACCTACACCTGCAACGTAGATCACAAGCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGACAGTTGAGCGCAAATGTT
GTGTCGAGTGCCACCGTGCCAGCACCACCTGTGGCAGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAAACCAAGGACACC
CTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACAGTGCCTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCCGAGGTCCAGTTCAACTG
GTACGTGGACGGCGTGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCACGGGAGGAGCAGTTCAACAGCACGTTCCGTGTGGTCA
GCGTCTCACCGTGTGACACAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGGCCTCCAGCC
CCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAACAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCATCCCGGGAGGA
GATGACCAAGAACCAGGTGACCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTACCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCA
ATGGGCAGCCGGAGAACAACCTACAAGACCACCTCCCATGCTGGACTCAGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTC
ACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACAC
GCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATGAGGATCC
```

【0027】

341-1-19 H鎖アミノ酸配列 (配列番号38)

```
MSVSFLIFLPVLGWPVLSQVQLQQSGPGLVKPSQTLSTCAISGDSVSSNSATWNWIRQSPSRDLEWLGRITYYRSKWY
RDYVGSVKSRIIINPDTSNQFSLQLNSVTPEDTAIYYCTRAQWLGGDYPYYSMVDVWVGQTTVTVSSASTKGPSVFPLA
PCSRSTSESTAALGLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNT
KVDKTVKRCCKVECPPCAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPRE
EQFNSTFRVSVLTVVHQDNLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFY
PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPMLDSGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVSMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
```

【0028】

341-1-19 L鎖 (配列番号39) :

ACTGCTCAGTTAGGACCCAGAGGGAACCATGGAAGCCCCAGCTCAGCTTCTCTTCTCCTGCTACTCTGGCTCCCAGATA
CCACCGGAGAAATTGTGTTGACACAGTCTCCAGCCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGG
GCCAGTCAGAGTGTAGCAGCTACTTAGCCTGGTACCAACAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGATGC
ATCCAACAGGGCCACTGGCATCCCAGCCAGGTTCACTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGCC
TAGAGCCTGAAGATTTTGCAGTTTATTACTGTCAGCAGCGTAGCAACACTTTCGGCCCTGGGACCAAGTGATATCAAA
CGTACG

【0029】

341-1-19 L鎖アミノ酸配列 (配列番号 40)

MEAPAQLLFLLLLWLPDTTGEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPA
RFSGSGSGTDFLTITSSLEPEDFAVYYCQQRSTFGPGTKVDIKRT

【0030】

2105のH鎖可変領域、及びL鎖可変領域をコードするDNA並びにH鎖及びL鎖のアミノ酸配列をそれぞれ以下に示す。

【0031】

H鎖DNAの翻訳開始点は、配列番号41の5'末端から70番目のアデニン (A) からはじまるATGコドンであり、抗体可変領域と定常領域の境界は5'末端から495番目のアデニン (A) と496番目のグアニン (G) 間に位置する。アミノ酸配列において、H鎖可変領域は配列番号42のN末端から142番目のセリン (S) 残基までであり、149番目のアラニン (A) 以降が定常領域である。遺伝子配列予測ソフトウェア (Signal P ver.2) により、H鎖のシグナル配列は配列番号42のN末端より19番目のcystein (C) までと予測された。成熟体のN末端は配列番号42の20番目のGlutamic acid (E) であるものと考えられる。

【0032】

L鎖DNAの翻訳開始点は、配列番号43の5'末端から28番目のAからはじまるATGコドンであり、可変領域は5'末端から405番目のアデニン (A) までである。アミノ酸配列において、可変領域は配列番号44のN末端から126番目のリジン (K) までである。遺伝子配列予測ソフトウェア (Signal P ver.2) により、L鎖のシグナル配列は配列番号44のN末端より20番目のGlycine (G) までと予測された。成熟体のN末端は配列番号44の21番目のGlutamic acid (E) であるものと考えられる。

【0033】

2105 H鎖 (配列番号: 41)

CTGAACACAGACCCGTCGACTCCCAGGTGTTTCCATTCACTGATCAGCACTGAACACAGAGGACTCACCATGGAGTTGGG
ACTGAGCTGGATTTTCTTTTGGCTATTTTAAAAGGTGTCCAGTGTGAAGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGG
TACAGCCTGGCAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTTGATGATTATGCCATGCACTGGGTCCGG
CAAGCTCCAGGGAAGGGCCTGGAGTGGGTCTCAGGTATTAGTTGGAATAGTGGTAGCTTGGTGCATGCGGACTCTGTGAA
GGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAACTCCCTGTATCTGCAAATGAACAGTCTGAGAGCTGAGGACACGG
CCTTGATTACTGTGCAAGAGATAGGCTATTTTCGGGGAGTTAGGTACTACGGTATGGACGTCTGGGGCAAGGACCACG
GTCACCGTCTCCTCAGCTAGCACCAAGG

【0034】

2105 H鎖アミノ酸配列 (配列番号: 42)

MELGLSWIFLLAILKGVCQEVQLVESGGGLVQPGRSRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPGKGLEWVSGISWNSGSLVHA
DSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTALYYCARDRLFGRVRYYGMDVWGQGTITVTVSSASTK

【0035】

2105 L鎖 (配列番号: 43)

CTGCTCAGTTAGGACCCAGAGGGAACCATGGAAGCCCCAGCTCAGCTTCTCTTCTCCTGCTACTCTGGCTCCCAGATAC
CACCGGAGAAATTGTGTTGACACAGTCTCCAGCCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGG
CCAGTCAGAGTGTAGCAGCTACTTAGCCTGGTACCAACAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGATGCA
TCCAACAGGGCCACTGGCATCCCAGCCAGGTTCACTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGCCT
AGAGCCTGAAGATTTTGCAGTTTATTACTGTCAGCAGCGTAGCCACTGGCTCACTTTCGGCGGGGGGACCAAGGTGGAGA
TCAAACGTACGGTG

【0036】

2105 L鎖アミノ酸配列 (配列番号: 44)

MEAPAQLFLLLLWLPDTTGEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFLTITSSLEPEDFAVYYCQQRSHWLTFGGGTKVEIKRTV

【0037】

2. アンタゴニスティック抗体の改変

抗CD40アンタゴニスティック抗体に関しても、アゴニスティック抗体と同様に、その作用メカニズムからADCC活性、CDC活性がないことが医薬品としてより好ましいと考えられる。さらに、アンタゴニスティック抗体の場合、ADCC活性が検出できない場合においても、*in vivo*でのFc receptorを介した抗体の架橋によって、シグナルを誘導する活性を回避することが重要となる。言い換えれば、*in vivo*において免疫を活性化しないことを確認することが必要となり、そのような活性をもつ抗体が医薬品としては、必要であると考えられる。抗CD40アンタゴニスト抗体は、自己免疫疾患や臓器移植拒絶などの治療薬として期待されているが、もしも、抗体投与後に何らかの働きで、微弱でもアゴニスト活性を誘導してしまうことがあった場合、症状の増悪をもたらし、期待した治療効果の反対の結果となる可能性が考えられるため、アゴニスト活性が全くない抗体が医薬品としてはより好ましい。本発明においては、サルを用いた試験により、*in vivo*においてもアゴニスト活性をより低減させるためには、IgG4に点変異L235E (235番目のLをEに置換することを意味する。以下同様。)を導入することが有効であることを示した。また、ADCC、CDC活性が低い抗体サブクラスとして、IgG4が挙げられるが、IgG4は組換え蛋白質としてCHOなどの細胞で発現させる場合、重鎖間のSS結合の形成が不十分で、半量体が分泌されることが報告されている (Rob C. Aalberse et. al., Immunology, 105, 9-19, 2002)。このため、抗体定常領域に変異を導入することにより、SS結合の形成を促進できることが報告されており、この変異の有用性に関しても評価した。具体的には、228番目のSをPに置換する変異を導入した (S. Angal et. al., Molecular Immunology, vol30, no1, 105-108, 1993)。

【0038】

アゴニスト抗体と同様にアンタゴニスト抗体においても、抗体の精製保存時の安定性は非常に重要なポイントとなる。いくつかの方法により、アンタゴニスト活性を保持しつつ、より物性的に優れた抗体を作製することが可能であると考えられる。現在までに市販されている抗体医薬品は、IgG1サブクラスに属するものがほとんどを占め、製剤上の問題点は特に報告されていない。このことから、抗体の定常領域がIgG1であることが物性的には有利である可能性が考えられる。しかし、抗CD40アンタゴニスト抗体の場合は、ADCC、CDC活性が低減されたものが望ましい。このため、IgG1の定常領域にいくつかの点変異を導入したものが望まれる。方法としては、上述した変異を導入することにより可能となる。例えば、P331G点変異を導入することにより、ADCC、CDC活性を低減させた、IgG1定常領域を作ることが可能であると考えられる。また、IgG4に点変異L235Eを導入することにより、*in vivo*において、微弱なアゴニスト活性が消失し、薬効的には優れた活性を示すが、物性面では低pHにおける安定性が低下するという減少が見られている。このため、L235をE以外の別のアミノ酸に置換することにより、物性面での機能向上が期待できる。また、4D11抗体については、その可変領域の構造が非常に類似している2B11抗体がある。2B11抗体は、アンタゴニスト活性は、4D11に劣るが、低pHにおける安定性は4D11に勝る。このことを利用し、可変領域の2B11由来のアミノ酸の一部を4D11に導入することによって、安定性を向上させることは可能であると考えられる。具体的には、重鎖のL38V、P58R、G62W、I79M、K81Y、H87Y、S98A、K109R、V120M、T124Aおよび、軽鎖のN75Sの点変異とその組み合わせによって、可能であると考えられる。具体的には、4D11重鎖可変領域の38番目LをVに置換した変異体 (L38Vと略記。以下同様)、P58R変異体、G62W変異体、I79M変異体、K81Y変異体、H87Y変異体、S98A変異体、K109R変異体、V120M変異体、T124A変異体、および、軽鎖のN75S変異体、または前述の点変異の組み合わせによって、可能であると考えられる。

【0039】

本件発明は、以下のアンタゴニスティック抗CD40抗体変異体を提供する。

- (1) 定常領域にADCCおよび／またはCDC活性の低減をもたらす1以上の変異もしくは置換を含むアンタゴニスティック抗CD40抗体の変異体。
- (2) 上記ADCCおよび／またはCDC活性の低減をもたらす変異もしくは置換が、サブクラスをヒトIgG4由来のものに置換するものである上記(1)のアンタゴニスティック抗CD40抗体の変異体。
- (3) 上記ADCCおよび／またはCDC活性の低減をもたらす変異もしくは置換が、定常領域のFc受容体との結合部位における置換である上記(1)のアンタゴニスティック抗CD40抗体の変異体。
- (4) 上記定常領域のFc受容体との結合部位における置換が、KabatらによるEUインデックスにより示される235位をグルタミン酸に置換したものである上記(3)のアンタゴニスティック抗CD40抗体の変異体。
- (5) 抗体重鎖間のSS結合の形成を促進させる変異をさらに含むものである、上記(1)から(4)のいずれかのアンタゴニスティック抗CD40抗体の変異体。
- (6) 上記抗体重鎖間のSS結合の形成を促進させる変異がKabatらによるEUインデックスにより示される228位をプロリンに置換したものである上記(5)のアンタゴニスティック抗CD40抗体の変異体。
- (7) 定常領域が、ヒトIgG1に由来するものである上記(1)から(6)のいずれか1項に記載のアンタゴニスティック抗CD40抗体の変異体。
- (8) ハイブリドーマ4D11(受託番号FERM BP-7758)の産生するモノクローナル抗体の重鎖および軽鎖可変領域を含む上記(1)から(7)のいずれかのアンタゴニスティック抗CD40抗体の変異体。
- (9) ハイブリドーマ4D11(受託番号FERM BP-7758)の産生するモノクローナル抗体の重鎖可変領域の38番目LのVへの置換、58番目PのRへの置換、62番目GのWへの置換、79番目IのMへの置換、81番目KのYへの置換、87番目HのYへの置換、98番目SのAへの置換、109番目KのRへの置換、120番目VのMへの置換、124番目TのAへの置換からなる群から選択される少なくとも一つの置換を含む上記(8)のアンタゴニスティック抗CD40抗体の変異体。
- (10) 4D11軽鎖可変領域の75番目NをSに置換した上記(8)または(9)のアンタゴニスティック抗CD40抗体の変異体。

【0040】

ここで、ADCC活性およびCDC活性が低下しているとは、上記変異体でない、抗CD40モノクローナル抗体に比べて、ADCC活性およびCDCが低下していることをいい、例えば、ハイブリドーマ4D11(受託番号FERM BP-7758)の産生するモノクローナル抗体に比べてADCC活性およびCDCが低下していることをいう。ADCC活性およびCDC活性は公知の方法により測定することができ、例えば本明細書の実施例に記載の方法で測定すればよい。ハイブリドーマ4D11(受託番号FERM BP-7758)の産生するモノクローナル抗体の重鎖および軽鎖可変領域配列は以下に示すとおりである。

【0041】

4D11のH鎖可変領域、及びL鎖可変領域をコードするDNA並びにH鎖及びL鎖のアミノ酸配列をそれぞれ以下に示す。

【0042】

H鎖DNAの翻訳開始点は、配列番号45の5'末端から16番目のアデニン(A)からはじまるATGコドンであり、抗体可変領域と定常領域の境界は5'末端から456番目のアデニン(A)と457番目のグアニン(G)間に位置する。アミノ酸配列において、H鎖可変領域は配列番号46のN末端から147番目のセリン(S)残基までであり、148番目のアラニン(A)以降が定常領域である。遺伝子配列予測ソフトウェア(Signal P ver.2)により、H鎖のシグナル配列は配列番号46のN末端より26番目のセリン(S)までと予測された。成熟体のN末端は配列番号46の27番目のグルタミン(Q)であるものと考えられる。

【0043】

L鎖DNAの翻訳開始点は、配列番号47の5'末端から59番目のAからはじまるATGコドン

であり、可変領域は5'末端から442番目のアデニン (A) までである。アミノ酸配列において、可変領域は配列番号48のN末端から128番目のリジン (K) までである。遺伝子配列予測ソフトウェア (Signal P ver.2) により、L鎖のシグナル配列は配列番号48のN末端より22番目のCystein (C) までと予測された。成熟体のN末端は配列番号48の21番目のAlanine (A) であるものと考えられる。

【0044】

4D11 H鎖 (配列番号: 45)

ATATGTCGACGAGTCATGGATCTCATGTGCAAGAAATGAAGCACCTGTGGTTCTTCCTCCTGCTGGTGGCGGCTCCAG
ATGGGTCTGTCCCAGCTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCAGGACTACTGAAGCCTTCGGAGACCCTGTCCCTCACCTGCA
CTGTCTCTGGCGGCTCCATCAGCAGTCCTGGTTACTACGGGGGCTGGATCCGCCAGCCCCAGGAAGGGGCTGGAGTGG
ATTGGGAGTATCTATAAAAGTGGGAGCACCTACCACAACCCGTCCCTCAAGAGTCGAGTCACCATATCCGTAGACACGTC
CAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAGCTCTGTGACCGCCGAGACACGGCTGTGTATTACTGTACGAGACCTGTAGTAC
GATATTTTGGGTGGTTCGACCCCTGGGGCCAGGAACCTGGTCACCGTCTCCTCAGCTAGC

【0045】

4D11 H鎖アミノ酸配列 (配列番号: 46)

MDLMCKMKHLWFFLLVAAPRWLSQLQLQESGPGLLPSETLSLTCTVSGGSISSPGYYGGWIRQPPGKLEWIGSIY
KSGSTYHNPSLKSRTVISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCTRPVVRVYFGWFDPPWGQGLTVTVSSAS

【0046】

4D11 L鎖 (配列番号: 47)

AGATCTTAAGCAAGTGAACAACCTCAGAGTACGCGGGGAGACCCACTCAGGACACAGCATGGACATGAGGGTCCCCGCTC
AGCTCCTGGGGCTTCTGCTGCTCTGGCTCCAGGTGCCAGATGTGCCATCCAGTTGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCT
GCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGCCGGGCAAGTCAGGGCATTAGCAGTGCTTTAGCCTGGTATCAGCAGAA
ACCAGGGAAAGCTCCTAAGCTCCTGATCTATGATGCCTCCAATTTGAAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTACGCGGCAGTG
GATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGCAACTTATTACTGTCAACAGTTAAT
AGTTACCCGACGTTTCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAACGTACG

【0047】

4D11 L鎖アミノ酸配列 (配列番号: 48)

MDMRVPAQLLGLLLWLPGARCAIQLTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGISSALAWYQQKPGKAPKLLIYDASNLESGV
PSRFSGSGSDFTLTISLQPEDFATYYCQQFNSTPTFGQGTKVEIKRT

【0048】

3. 定義

本明細書で使用する用語の定義は以下のとおりである。

本発明でいう「ヒトCD40」とは、クラークら (E. A. Clark et. al., Proc. Natl. Aca d. Sci. USA 83: 4494, 1986) 又はスタメンコビックら (I. Stamenkovic et. al., EMBO J. 8:1403, 1989) により示されているアミノ酸配列を有するポリペプチドを意味し、特にB細胞、DC、マクロファージ、内皮細胞、上皮細胞、あるいはそれらの腫瘍細胞表面に発現する抗原ポリペプチドである。

【0049】

「抗CD40抗体」とは、細胞発現CD40、全長CD40又は部分長CD40に対するモノクローナル抗体のいずれをも意味する。

【0050】

さらに、本発明で「抗体」とは、イムノグロブリンを構成する重鎖可変領域及び重鎖定常領域並びに軽鎖の可変領域及び軽鎖の定常領域をコードする遺伝子 (「抗体遺伝子」と総称する) に由来するものである。本発明の抗体には、いずれのイムノグロブリンクラス及びアイソタイプを有する抗体をも包含する。本発明における抗体の「機能的断片」とは、前記で定義した抗体の一部分 (部分断片) であって、抗体の抗原への作用を1つ以上保持するものを意味し、具体的にはF(ab')₂、Fab'、Fab、Fv、ジスルフィド結合FV、一本鎖FV(scFV)、およびこれらの重合体等が挙げられる (D.J.King., Applications and Engineering of Monoclonal Antibodies., 1998 T.J.International Ltd)。

【0051】

本発明における、CH1、ヒンジ、CH2、CH3とは、抗体重鎖定常領域の一部を示しており、KabatらのEUインデックス (Kabat et. al., Sequences of proteins of immunological interest, 1991 Fifth edition) に基づいている。CH1は、EUインデックス118から215、ヒンジはEUインデックス216から230、CH2はEUインデックス231から340、CH3はEUインデックス341から446と定義される。

【0052】

本発明で「ヒト抗体」とは、ヒト由来の抗体遺伝子の発現産物である抗体を意味する。

「アゴニスティック」とは、B細胞、腫瘍細胞又は樹状細胞などの細胞表面上に発現するCD40に、そのリガンドが結合することを促進する作用、あるいは、CD40リガンドがCD40発現細胞に与える影響の1つ以上を、CD40を発現する細胞に与える作用を意味し、「アゴニスティック抗体」とは、そのようなアゴニスティック作用を有する抗体を意味する。

【0053】

「アンタゴニスティック」とは、B細胞、腫瘍細胞又は樹状細胞などの細胞表面上に発現するCD40にそのリガンドが結合することを阻害する作用、あるいは、CD40リガンドがCD40発現細胞に与える影響の1つ以上を中和する作用を意味し、「アンタゴニスティック抗体」とはそのような作用を有する抗体を意味する。

【0054】

「抗体の変異体」とは、ハイブリドーマにより生産される抗体のアミノ酸配列に、1アミノ酸以上の欠失、置換もしくは付加を生じたものをいう。本件発明の抗体の変異体は、当業者に周知であるハイブリドーマからの抗体遺伝子の単離方法、ヒト抗体定常領域の配列情報、遺伝子への部位特異的変異導入方法等を用いることにより適宜作製しうる。

【0055】

本発明においては、抗CD40抗体は、抗体遺伝子を発現ベクターに組み込み、ベクターを適当な宿主細胞に導入し、細胞もしくは細胞の培養上清から回収、精製することにより得ることができる。

【0056】

ベクターには、宿主細胞で自律的に増殖し得るか、宿主細胞の染色体に組み込まれ得るファージ又はプラスミドが使用される。プラスミド DNAとしては、大腸菌、枯草菌又は酵母由来のプラスミドなどが挙げられ、ファージDNAとしてはλファージ等が挙げられる。

【0057】

形質転換に使用する宿主としては、目的の遺伝子を発現できるものであれば特に限定されるものではない。例えば、細菌（大腸菌、枯草菌等）、酵母、動物細胞（COS細胞、CHO細胞等）、昆虫細胞が挙げられる。

【0058】

宿主への遺伝子の導入方法は公知であり、任意の方法（例えばカルシウムイオンを用いる方法、エレクトロポレーション法、スフェロプラスト法、酢酸リチウム法、リン酸カルシウム法、リポフェクション法等）が挙げられる。また、後述の動物に遺伝子を導入する方法としては、マイクロインジェクション法、ES細胞にエレクトロポレーションやリポフェクション法を使用して遺伝子を導入する方法、核移植法などが挙げられる。

【0059】

本発明において、「培養物」とは、(a) 培養上清、(b) 培養細胞若しくは培養菌体又はその破砕物、(c) 形質転換体の分泌物のいずれをも意味するものである。形質転換体を培養するには、使用する宿主に適した培地を用い、静置培養法、ローラーボトルによる培養法などが採用される。

【0060】

培養後、目的タンパク質が菌体内又は細胞内に生産される場合には、菌体又は細胞を破砕することにより抗体を採取する。また、目的抗体が菌体外又は細胞外に生産される場合には、培養液をそのまま使用するか、遠心分離等により菌体又は細胞を除去する。その後、タンパク質の単離精製に用いられる各種クロマトグラフィーを用いた一般的な生化学的方法を単独で又は適宜組み合わせることで用いることにより、前記培養物中から目的の抗体を単

離精製することができる。

【0061】

さらに、トランスジェニック動物作製技術を用いて、目的抗体の遺伝子が内在性遺伝子に組み込まれた動物宿主、例えばトランスジェニックウシ、トランスジェニックヤギ、トランスジェニックヒツジ又はトランスジェニックブタを作製し、そのトランスジェニック動物から分泌されるミルク中からその抗体遺伝子に由来するモノクローナル抗体を大量に取得することも可能である (Wright, G., et al. (1991) Bio/Technology 9, 830-834)。ハイブリドーマをインビトロで培養する場合には、培養する細胞種の特長、試験研究の目的及び培養方法等の種々条件に合わせて、ハイブリドーマを増殖、維持及び保存させ、培養上清中にモノクローナル抗体を産生させるために用いられるような既知栄養培地、あるいは既知の基本培地から誘導調製されるあらゆる栄養培地を用いて実施することが可能である。

【0062】

4. 抗体の性質

(1) アゴニスティック抗体の場合

本発明のアゴニスティック抗体の変異体は、アゴニスティック活性を保持しつつ、ADCC、CDC活性がオリジナルの抗体に比べ、同程度以下になっているため、免疫担当細胞を傷害することなく、免疫系を活性化することができると考えられる。そのため、オリジナル抗体に比べ同程度以上の免疫活性化作用と、同程度以下のCD40発現細胞への障害による毒性を示すことが期待される。

【0063】

(2) アンタゴニスティック抗体の場合

本発明のアンタゴニスティック抗CD40抗体の変異体は、CD40Lによる免疫活性化シグナルを抑制する活性を保持しつつ、改変前の抗体に比べ、ADCC、CDC活性が低減している。また、in vivoにおいても、Fc レセプターを介すると考えられる、シグナル誘導活性の低下が期待される。

【0064】

5. 医薬組成物

また、本発明の抗体の精製された製剤を含有する医薬組成物もまた、本発明の範囲内に含まれる。このような医薬組成物は、好ましくは、抗体に加えて、生理学的に許容され得る希釈剤またはキャリアを含んでおり、他の抗体または抗生物質のような他の薬剤との混合物であってもよい。適切なキャリアには、生理的食塩水、リン酸緩衝生理食塩水、リン酸緩衝生理食塩水グルコース液、および緩衝生理食塩水が含まれるが、これらに限定されるものではない。或いは、抗体は凍結乾燥 (フリーズドライ) し、必要とされるときに上記のような緩衝水溶液を添加することに理再構成して使用してもよい。投与経路は、経口ルート、並びに静脈内、筋肉内、皮下および腹腔内の注射または配薬を含む非経腸的ルートである。

【0065】

この場合、本発明の抗体の有効量と適切な希釈剤及び薬理学的に使用し得るキャリアとの組合せとして投与される有効量は、1回につき体重1kgあたり0.0001mg~100mgであり、2日から8週間間隔で投与される。

【0066】

本発明の抗体を含む医薬組成物を使用する場合は、アゴニスティック抗体については、免疫賦活剤 (抗ウイルス剤、抗感染症剤)、抗腫瘍剤、自己免疫疾患治療剤であり、これらの疾患が複数併発してもよい。あるいは、ガン特異的ペプチドなどのワクチンとアジュバントとして併用することもできる。また、アンタゴニスティック抗体については、臓器移植時における免疫抑制剤 (脾臓移植や腎臓などの移植時における拒絶反応、GVHDの予防又は治療剤) として、あるいは自己免疫疾患 (例えば、リウマチ、動脈硬化治療薬、多発性硬化症、全身性エリトマトーデス、特発性血小板減少症、クローン病など) 治療剤、喘息などアレルギー治療剤、血液凝固第VIII因子阻害症候群治療剤の治療薬として有用で

あり、これらの疾患が複数併発してもよい。

【0067】

6. エピトープ

優れたアゴニスト活性を有するKM341-1-19抗体および2105抗体、優れたアンタゴニスト活性を有する4D11抗体のCD40に対する結合エピトープが決定された(実施例2)。本件発明は、上記抗体とは異なる可変領域配列を有し、かつ上記抗体のいずれかと同じエピトープを認識するアゴニスティックもしくはアンタゴニスティック抗CD40抗体を提供する。このような抗体は下記の要領によって取得できる。

【0068】

例えばKM341-1-19抗体と同じエピトープを認識するアゴニスティック抗CD40抗体を取得する場合、CD40をマウス等に免疫して得られたモノクローナル抗体の中から、CD40への結合に際してKM341-1-19抗体と競合するものを常法により選抜する。選抜されたものについて実施例2に記載された方法に基づき、ペプチドに対する結合パターンがKM341-1-19抗体と同じものを選抜する。

【実施例】

【0069】

以下、実施例を以って本発明をさらに詳細に説明するが、本発明がその実施例に記載される形態のみに限定されるものではない。

【0070】

実施例1 抗体、抗原蛋白質の発現精製

抗体発現細胞は、抗体の可変領域を含むベクタープラスミドを、CHO細胞(ATCC)に遺伝子導入し、G418により選択することにより安定発現株を作製した。

また、変異型抗原の発現は、ベクターを一過性にHEK細胞(ATCC)に導入することによって実施した。

【0071】

上記培養上清からの抗CD40抗体の精製は以下の方法で行った。抗CD40抗体を含む培養上清をHyper D Protein A カラム(日本ガイシ製)あるいはマウスIgG1の精製にはProtein Gカラム(アマシャムファルマシアバイオテク)を用い、付属の説明書に従い吸着緩衝液としてPBS(-)、溶出緩衝液として0.1 M クエン酸ナトリウム緩衝液(pH 3)を用いてアフィニティー精製した。溶出画分は1 M Tris-HCl (pH 8.0)あるいはNa₂HP0₄溶液を添加してpH7.2 付近に調整した。調製された抗体溶液は、透析膜(10000カット、Spectrum Laboratories社製)あるいはSPカラム(アマシャムファルマシアバイオテク)を用いてPBS(-)に置換し、孔径0.22 μ m のメンブランフィルターMILLEX-GV (MILLIPORE 製)でろ過滅菌した。精製抗体の濃度は280 nmの吸光度を測定し、1 mg/ml を1.45 OD として算出した。

【0072】

実施例2 エピトープの決定

CD40の細胞外領域の175アミノ酸(配列番号1)をカバーする、13-merペプチドを2アミノ酸づつ、ずらして合計82種のペプチド(配列番号49から130)をCellulose膜上にC末端からスポット状に合成し、N末をアセチル化した(JERINI社:ドイツ)。以降の反応は常法のウェスタン解析(Reineke, U.ほか.(2001). "Epitope mapping with synthetic peptides prepared by SPOT synthesis." Antibody Engineering (Springer Lab Manual) Eds.: Kontermann/Dubel, 433-459. など参照)を元に実施した。解析はLumiImagerTM (Boehringer-Mannheim社)を使用し、各スポットの発色強度を数値化した(図1A-1, A-2, B-1, B-2)。

【0073】

その結果、4D11は20-24番目と41番目のペプチド、2105は12-23番目と64番目、KM341-1-19は41, 42番目のペプチド、KM643-4-11は43番目のペプチド、F72は75番目、110は64番目のペプチドを、F4-465は、34, 35, 54, 55, 65, 66, 75番目のペプチドを、KM281-1-10は21, 24, 64, 75番目のペプチドを、2B11(新規抗体)は21, 24, 64番目のペプチドを、F76(新規抗体)は21, 35, 51, 52番目のペプチドを強く認識することがわかった。

【0074】

抗CD40抗体の結合部位を確定するため、変異を導入したCD40-FC fusion proteinを作製し結合能をELISAにより調べた。抗CD40抗体はマウスのB細胞に対して交差性を示さないため、マウスCD40のアミノ酸配列に部分的に変換した5種類のCD40Fc fusion proteinを作製し、この抗原に対する、抗体の結合を調べた。変異型CD40-FC融合蛋白質の作製方法は以下に示す。変異部位は、抗体が強く結合するペプチドの配列の部分に、マウスCD40の配列を導入することにより作製した。CD40mut1は、15番ペプチドに相当する部位のEFTEをALEKに、CD40mut2は、21番ペプチドに相当する部位のLDTをSAQへ、CD40mut3は、24番ペプチドに相当する場所のTHをIRへ、CD40mut4は、42番目ペプチドに相当する部位のEEGWをKEGQへ、CD40mut5は、64番目ペプチドに相当する部位をVSSAからQSSLへ変換した。変異体の作製は、遺伝子工学的手法に従って実施した(図2A、B、C)。解析の結果2105は、CD40mut1への結合能を著しく低下させていることがわかった。また、4D11, 2B11は、CD40mut2への結合能を低下させていることがわかった。

【0075】

実施例3 抗CD40アゴニスティック抗体のRamos細胞に対する結合活性

2×10^6 /mlの濃度でRamos細胞株を0.1%NaN₃、2%FCS含有PBSの染色バッファー(SB)に浮遊させた。細胞浮遊液(100 μ l/ウェル)を96-well 丸底プレート(ベクトンディッキンソン社製)に分注した。各々のハイブリドーマの培養上清(50 μ l)を加え、氷温下30分間インキュベートした。陰性コントロールとしてヒト血清アルブミンに対するヒトIgG1抗体を用い、ハイブリドーマ培養地で2 μ g/mlの濃度に調製し、50 μ l添加後氷温下15分間インキュベートした。SBで洗浄した後、250倍希釈したR-PE蛍光標識抗ヒト抗体(Southern Biotechnology社製)50 μ lを加え、氷温下15分間インキュベートした。SBで2回洗浄した後、300~500 μ lのFACS緩衝液に懸濁し、FACS(FACSort、FACScan、ベクトンディッキンソン社製)で各細胞の蛍光強度を測定した。

【0076】

実施例4 抗CD40アゴニスティック抗体のRamos細胞に対するアゴニスティック活性評価

5.0×10^5 個/mlのRamos細胞懸濁液を96ウェルプレートに100 μ l/wellで播種した。ハイブリドーマ培養上清又は精製抗体を20 μ g/mlに培地で希釈し、96ウェルプレートに100 μ l/wellの濃度で添加した。一晚培養後、細胞を集めR-PE標識抗CD95抗体(Pharmingen NJ)を用い、FACScanあるいはFACSort(ベクトンディッキンソン)を使って解析した。

【0077】

実施例5 Ramos細胞における抗CD40アンタゴニスティック抗体によるCD95発現抑制

1.0×10^6 個/mlのRamos細胞懸濁液を96ウェルプレートに50 μ l/wellで播種した。ハイブリドーマ培養上清又は精製抗体を2 μ g/mlに培地で調整し、96ウェルプレートに100 μ l/well添加した。可溶性CD40リガンド(ALEXIS CORPORATION)を4 μ g/mlと抗FLAG抗体(M2、シグマ)4 μ g/mlとを培地に添加し、96ウェルプレートに50 μ l/well添加した。一晚培養後、細胞を集めR-PE標識抗CD95抗体(Pharmingen NJ)を用い、FACSを使って解析した。

【0078】

実施例6 抗CD40抗体CDC活性の測定

CDCアッセイは、Cr⁵¹ラベルしたターゲット細胞2000個に対して、最終濃度5%のヒト血清由来補体(SIGMA社製)もしくはウサギ血清由来補体(CEDARLANE LABORATORIES LIMITED、オンタリオ、カナダ)を、丸底96ウェルプレート中で全体容量200mLで、各抗体濃度とともに37℃、5% CO₂存在下で2時間培養した。

【0079】

培養後、プレートを遠心して細胞を沈めた後、上清50 μ Lを粉末シンチレーター含有の96穴プレート(LumaplateTM-96:パッカー社製)に移し、55℃、1.5時間で乾燥した。乾燥を確認後、専用カバー(TopSealTM-A:96-well Microplates:パッカー社製)でプレートをカバーし、シンチレーションカウンター(トップカウント:パッカー社製)で γ 線量を測定した。

【0080】

実施例 7 抗CD40抗体のADCC活性測定

抗体を介した細胞傷害性活性は、NK細胞或いは好中球などのキラー活性を有する細胞と抗体の存在下でターゲット細胞への傷害活性（抗体依存性細胞性細胞傷害活性（Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity）、以下、ADCC）、及び補体と抗体の存在下でターゲット細胞への傷害活性（補体依存性細胞傷害活性（Complement-Dependent Cytotoxicity）以下、CDC）の測定を実施した。コントロールとしてhIgGを用いた。

【0081】

方法は簡単には、ターゲット細胞に放射性クロム（ Cr^{51} ）を細胞質内に取り込ませ、細胞死により培養液中に遊離される Cr^{51} 量を γ 線量で測定した。

【0082】

具体的には、ターゲット細胞としてバーキットリンパ腫細胞株Raji（ATCC CCL-86）を 10^6 個を $15\mu\text{L}$ のFetal Calf Serum（FCS）に懸濁し、 $50\mu\text{L}$ （ 37MBq/mL ）の Cr^{51} ラベルされたクロム酸ナトリウム（パーキエルマー社製：以下 Cr^{51} と書く）を添加し、1時間 37°C で培養した。次に、培地を 10mL 添加し、遠心して培地を捨てることを3回繰り返すことで、細胞内に取り込まれていない Cr^{51} を除いた。

【0083】

ADCCアッセイは、 Cr^{51} ラベルしたターゲット細胞2000個に対して、実施例6記載の方法で取得した健常人末梢血単核球200000個を、丸底96ウェルプレート（Falcon社製）中で全容量 200mL で、各抗体濃度とともに 37°C 、5% CO_2 存在下で4時間培養した。

【0084】

培養後、プレートを遠心して細胞を沈めた後、上清 $50\mu\text{L}$ を粉末シンチレーター含有の96穴プレート（LumaplateTM-96：パッカード社製）に移し、 55°C 、1.5時間で乾燥した。乾燥を確認後、専用カバー（TopSealTM-A:96-well Microplates：パッカード社製）でプレートをカバーし、シンチレーションカウンター（トップカウント：パッカード社製）で γ 線量を測定した。

【0085】

実施例 8 抗CD40アゴニスティック抗体P331S変異体の作製と活性評価

抗CD40アゴニスティック抗体KM341-1-19および2105の遺伝子クローニングに関してはWO 02/099186に記載されている。IgG2定常領域の331番目ProをSerに変換することによってCDC活性が低減するという報告がある。KM341-1-19、2105抗体に関してもCDC活性を低減するために、P331S変異をIgG2定常領域に導入した。

【0086】

抗体発現ベクターN5KG1-Val Lark（IDEC Pharmaceuticals：以下N5KG1と略記）の、ヒトIgG1定常領域をヒトIgG2に置き換えたもの（N5KG2）を作製し、IgG2の331番目ProをSerに変換した変異を作製した。IgG2定常領域のcDNAクローニングは、KM341-1-19ハイブリドーマを遠心によって集め、TRIZOL（Gibco BRL）を添加し、取扱説明書にしたがって、TotalRNAを抽出した。抗体cDNAの可変領域のクローニングは、CLONTECH社のSMART RACE cDNA amplification Kitを用い、添付の説明書にしたがって行った。 $5\mu\text{g}$ のtotal RNAを鋳型として、1st Strand cDNAを作製した。Primerの配列は、tnIgG3Nhe：atatGCTAGCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGC（配列番号2）G、tnIgG2Bam：atatggatccTCATTTACCCGGAGACAGGAGAGGCTC（配列番号3）を使い、ZtaqPCR kit（Takara）を用いて 98°C 1秒、 55°C 30秒、 72°C 1分 x 30 cycleでPCRを行い、遺伝子を増幅した。反応後、QIAGEN PCR purification kitで精製し、NheI、BamHIでdigestionし、N5KG1に組み込み配列の確認をおこなった。このベクターをN5KG2とした。

【0087】

N5KG2Ser（331番目をSerに換えたもの）は、N5KG2を鋳型として、プライマーIgG3Nhe：atatGCTAGCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCG（配列番号4）、G2Ser2：GTTTCTCGATGGAGGCTGGGAGGCC（配列番号5）で 98°C 1秒、 60°C 30秒、 72°C 30秒の反応を15回行った。同時に、N5KG2を鋳型として、プライマーIgG2Bam：atatggatccTCATTTACCCGGAGACAGGAGAGGCTC（配列番号6）G2Ser1：GGCCTCCAGCCTCCATCGAGAAAAC（配列番号7）を用いて、 98°C 1秒

、60℃30秒、72℃30秒の反応を15回行った。増幅したDNA断片をPCR purification kit で精製し、2つの精製DNA断片を等量混合したのち、98℃1秒、60℃30秒、72℃30秒の反応を5回行い、プライマーIgG3Nhe、IgG2Bamを加えて、15回反応した。増幅したDNA断片をNheI、BamHIで切断し、N5KG1ベクターのIgG1定常領域と置き換えた(N5KG2Ser)。BglIII、NheIで消化した抗体可変領域の配列を含む断片をN5KG2serベクターに組み込んだ。

【0088】

上述の方法で発現精製した抗体を用いて、Ramos細胞に対する結合能(図3A)、アゴニスティック活性(図3B)の評価を実施した。P331Sの変異の導入によって、活性の変動は見られなかった。

【0089】

実施例9 抗CD40アゴニスティック抗体331ser変異体のCDC活性の測定

上述の方法によりCDC活性を測定した。ウサギ血清由来補体を使用し、Ramos細胞を標的細胞として使用した。その結果、KM341-1-19、は1μg/mlの抗体濃度ではIgG2に比べIgG2serが顕著にCDC活性が減少していることがわかった(図4A)。一方ヒト補体を使用した場合は、変化は見られなかった(図4B)。

【0090】

実施例10 アゴニスト抗CD40抗体定常領域変換体の作製と活性測定

WO02/088186に記載の抗CD40抗体のうち、最も強いアゴニスティック活性を示すもの2つ(KM341-1-19, 2105)は、IgG2サブクラスであった。IgG2サブクラスがCD40の活性化に重要であるかどうか調べるため、IgG1, IgG3, IgG4に抗体定常領域を変換した組換え蛋白質を作製し、抗原への結合能と、Ramos細胞におけるCD95発現促進活性は、実施例実施例4、6に従って実施した。IgG1型の発現に関しては、N5KG1をIgG2, IgG3の発現に関しては、N5KG1の定常領域を、それぞれIgG2, IgG3に置きかえた発現ベクター、N5KG2, N5KG3を用いた。IgG3定常領域のcDNAクローニングはIgG2のクローニング方法を一部改変し、IgG3特異的プライマーを使用することで実施した。IgG4の発現にはN5KG4PE(IDEC Pharmaceuticals)を用いた。

【0091】

抗体蛋白質の発現は、実施例1にしたがって実施した。ヒトCD40を発現しているRamos細胞への結合活性は、KM341-1-19, 2105ともIgG2からIgG1, 3, 4へ変換したことによる影響は見られなかったが(図5A-1、図5A-2)、Ramos細胞におけるCD95の発現促進活性は、1/10以上低下していることがわかった(図5B-1、図5B-2)。このことは、2105, KM341-1-19の強いアゴニスティック活性は、抗体の結合領域を決定する可変領域の構造以外に、抗体の定常領域の構造も重要であることが示された。そこで、IgG2の定常領域内のどの領域がアゴニスティック活性に重要であるかどうか調べるために、IgG2とIgG4の構造を混ぜたキメラ抗体を作製し、活性を測定した。キメラ抗体はKM341-1-19, 2105のそれぞれに対して、IgG2/4(CH1, ヒンジ領域はIgG2、それ以降はIgG4), IgG4/2/4(ヒンジ領域は、IgG2。それ以外はIgG4), IgG2/4/4(CH1はIgG2、それ以外はIgG4), IgG4/2/2(CH1はIgG4、それ以外はIgG2)の4種類ずつ作製した。

【0092】

IgG2/4抗体発現のためのベクターN5KG2/4は、Ztaq PCR kit(Takara)を用いて作製した。N5KG2を鋳型として、プライマーIgG3Bam: atatggatccTCATTTACCCGAGACAGGGAGAGGC(配列番号8)、24Chi4: AGGGGTCCGGGAGATCATGAGAGTGTCTT(配列番号9)で98℃1秒、60℃30秒、72℃30秒の反応を15回行った。同時に、N5KG4(IDEC Pharmaceuticals)を鋳型として、プライマー24Chi3: AAGGACACTCTCATGATCTCCCGACCCCT(配列番号10)、linkH2: tgatcatatcgtatgatcagcgc(配列番号11)を用いて、98℃1秒、60℃30秒、72℃30秒の反応を15回行った。増幅したDNA断片をPCR purification kit で精製し、2つの精製DNA断片を等量混合したのち、98℃1秒、60℃30秒、72℃30秒の反応を5回行い、プライマーIgG3Bam、linkH2: tgatcatatcgtatgatcagcgc(配列番号12)を加えて、15回反応した。増幅したDNA断片をNheI, BamHIで切断し、N5KG1ベクターのIgG1定常領域と置き換えた。

【0093】

IgG4/2/4発現のためのベクターN5KG4/2/4は、N5KG4を鋳型として、linkH: gggtacgtcctcacattcagtgatcag (配列番号13), G2Hin3: TTTGCGCTCAACTGTCTTGCCACCTTGGTGTGCTGGG (配列番号14), と linkH2: tgatcatcacgtagatatcacggc (配列番号15), G2Hin4: ACAGTTGAGCGCAAATGTTGTGTCGAGTGCCACCG (配列番号16) を用いてそれぞれ、98℃1秒、60℃30秒、72℃30秒の反応を15回行った。増幅したDNA断片をPCR purification kit で精製し、2つの精製DNA断片を等量混合したのち、これを鋳型として98℃1秒、60℃30秒、72℃30秒の反応を5回行い、linkH, linkH2プライマーを加えて、15回反応した。増幅したDNA断片をNheI, BamHIで切断し、N5KG1ベクターのIgG1定常領域と置き換えた。

【0094】

IgG2/4/4発現のためのベクターN5KG2/4/4は、N5KG2を鋳型として、プライマーlinkH: gggtacgtcctcacattcagtgatcag (配列番号17), G4CH1-2: GGTGTTGCTGGGCTTGTGATCTACGTCAG (配列番号18) で98℃1秒、60℃30秒、72℃30秒の反応を15回行った。同時に、N5KG4を鋳型として、プライマーG4CH1-1: CTGCAACGTAGATCACAAGCCCAGCAACACC (配列番号19), linkH2: tgatcatcacgtagatatcacggc (配列番号20) を用いて、98℃1秒、60℃30秒、72℃30秒の反応を15回行った。増幅したDNA断片をPCR purification kit で精製し、2つの精製DNA断片を等量混合したのち、98℃1秒、60℃30秒、72℃30秒の反応を5回行い、プライマーlinkH, linkH2を加えて、15回反応した。増幅したDNA断片をNheI, BamHIで切断し、N5KG1ベクターのIgG1定常領域と置き換えた。

【0095】

IgG4/2/2発現のためのベクターN5KG4/2/2は、N5KG4を鋳型として、プライマーlinkH: gggtacgtcctcacattcagtgatcag (配列番号21), G4CH1-2: GGTGTTGCTGGGCTTGTGATCTACGTCGAG (配列番号22) で98℃1秒、60℃30秒、72℃30秒の反応を15回行った。同時に、N5KG2を鋳型として、プライマーG4CH1-1: CTGCAACGTAGATCACAAGCCCAGCAACACC (配列番号23), linkH2: tgatcatcacgtagatatcacggc (配列番号24) を用いて、98℃1秒、60℃30秒、72℃30秒の反応を15回行った。増幅したDNA断片をPCR purification kit で精製し、2つの精製DNA断片を等量混合したのち、98℃1秒、60℃30秒、72℃30秒の反応を5回行い、プライマーlinkH, linkH2を加えて、15回反応した。増幅したDNA断片をNheI, BamHIで切断し、N5KG1ベクターのIgG1定常領域と置き換えた。

【0096】

KM341-1-19, 2105に関してそれぞれ4種のキメラ抗体の結合活性を調べた結果では、オリジナルのIgG2との違いは認められなかったが(図6A-1、図6A-2)、アゴニスティック活性に関しては、KM341-1-19, 2105の両者ともIgG2/4/4のみが活性が著しく低下していた(図6B-1、図6B-2)。この結果からは、IgG2のヒンジ領域がアゴニスティック活性に重要であることが解った。

【0097】

さらにヒンジ領域のなかで、どの配列が重要であるか調べた。ヒンジ領域はアッパーヒンジ、ミドルヒンジ、ロウアーヒンジの3つの部位に分けられるが(Ole H Brekke et. al. Immunology Today 1995, 16, 85-90)、そのうちそれぞれ、IgG2に特異的配列をIgG4のものに置換した。アッパーヒンジ(Kabat EU code 216から)、ミドルヒンジ(Kabat EU code 226から)、ロウアーヒンジ(Kabat EU code 231から)に変異を導入した抗体をIgG2UH4, IgG2MH4, IgG2LH4とし、それぞれの発現ベクターは、N5KG2UH4, N5KG2MH4, N5KG2LH4とした。

【0098】

N5KG2UH4は、N5KG2を鋳型として、プライマーlinkH: gggtacgtcctcacattcagtgatcag (配列番号25), UH4-2: CACAACATTTggaCTCAACTcTCTGTCCACC (配列番号26) で98℃1秒、60℃30秒、72℃30秒の反応を15回行った。同時に、N5KG2を鋳型として、プライマーUH4-1: GGTGGACAAGAgAGTTGAGtccAAATGTTGTG (配列番号27), linkH2: tgatcatcacgtagatatcacggc (配列番号28) を用いて、98℃1秒、60℃30秒、72℃30秒の反応を15回行った。増幅したDNA断片をPCR purification kit で精製し、2つの精製DNA断片を等量混合したのち、98℃1秒、60℃30秒、72℃30秒の反応を5回行い、プライマーlinkH, linkH2を加え

て、15回反応した。増幅したDNA断片をNheI, BamHIで切断し、N5KG1ベクターのIgG1定常領域と置き換えた。

【0099】

N5KG2MH4は、N5KG2を鋳型として、プライマーlinkH: gggtacgtcctcacattcagtgatcag (配列番号29), UM4-2: GGCACGGTGGGCAtgggggaccataTTTGGCGCTC (配列番号30) で98℃1秒、60℃30秒、72℃30秒の反応を15回行った。同時に、N5KG2を鋳型として、プライマーUM4-1: GAGCGCAAAtatgtgtccccaTGCCACCGTGCC (配列番号31)、linkH2: tgatcatatcagtagatatacagggc (配列番号32) を用いて、98℃1秒、60℃30秒、72℃30秒の反応を15回行った。増幅したDNA断片をPCR purification kit で精製し、2つの精製DNA断片を等量混合したのち、98℃1秒、60℃30秒、72℃30秒の反応を5回行い、プライマーlinkH、linkH2を加えて、15回反応した。増幅したDNA断片をNheI, BamHIで切断し、N5KG1ベクターのIgG1定常領域と置き換えた。

【0100】

N5KG2LH4は、N5KG2を鋳型として、プライマーlinkH: gggtacgtcctcacattcagtgatcag (配列番号33), UL4-2: GAAGACTGACGGTCCccccaggaactcTGGTGCTGGGCA (配列番号34) で98℃1秒、60℃30秒、72℃30秒の反応を15回行った。同時に、N5KG2を鋳型として、プライマーUL4-1: TGCCCAGCACCAgagttcctggggGGACCGTCAGTCTTC (配列番号35)、linkH2: tgatcatatcagtagatatacagggc (配列番号36) を用いて、98℃1秒、60℃30秒、72℃30秒の反応を15回行った。増幅したDNA断片をPCR purification kit で精製し、2つの精製DNA断片を等量混合したのち、98℃1秒、60℃30秒、72℃30秒の反応を5回行い、プライマーlinkH、linkH2を加えて、15回反応した。増幅したDNA断片をNheI, BamHIで切断し、N5KG1ベクターのIgG1定常領域と置き換えた。

【0101】

KM341-1-19, 2105に関して、それぞれ3種類のキメラ抗体の抗原にたいする結合活性を調べたが、同等であった(図6A-1、図6A-2)。一方Ramos細胞に対するアゴニスティック活性に関してはIgG2UH4, IgG2MH4で著しく低下していた(図6B-1、図6B-2)。以上のことから、抗CD40抗体KM341-1-19, 2105のIgG2サブクラス依存のアゴニスティック活性は、ヒンジ領域のうち、アッパーヒンジ、ミドルヒンジの構造が重要であることがわかった。

【0102】

IgG2サブクラスがアゴニスティック活性に重要であることが判明したため、IgG2以外のサブクラスの抗体をIgG2サブクラスに変換してアゴニスティック活性が増強するかどうか調べた。数個のクローンについて調べたうち、F76は、IgG1からIgG2にサブクラスを変換することによって、アゴニスティック活性を増強することが出来た(図7A,B)。

【0103】

実施例11 抗CD40アンタゴニスト抗体変異体の作製

もともとのサブクラスはIgG1である、W002/088186に記載の4D11抗体遺伝子の重鎖、軽鎖を含むDNA断片を、BglIII, NheIで消化、精製した後、N5KG4PE, N5KG4P, N5KG4ベクター(IDEC Pharmaceuticals)につなぎ換えた。N5KG4PEはIgG4定常領域に、S228P及びL235E、N5KG4PはS228Pの点変異をそれぞれ含む。抗体蛋白質の発現、精製は上述の方法によって実施した。精製抗体はRamos細胞への結合を指標に、上述の方法に従って実施した。IgG1, IgG4, IgG4P, IgG4PEのRamos細胞への結合活性の変化は見られなかった(図8A)。また上述の方法によってアンタゴニスティック活性の比較を行ったが、IgG1とIgG4各種変異体との間には、アンタゴニスティック活性に関しては、差は見出されなかった(図8B)。

【0104】

実施例12 抗CD40アンタゴニスト抗体変異体のADCC活性、CDC活性評価

抗CD40変異抗体のADCC活性、CDC活性は、上述の方法によって実施した。

【0105】

ヒトMNCをエフェクター細胞として、CD40発現Daudi細胞を標的として使用した場合、4D1

1のものとサブクラスであるIgG1と比較して、IgG4、IgG4PEの2つの変異体はそれぞれADC活性の著しい低下が観察された(図9)。

【0106】

CDC活性に関しては、IgG1とIgG4Pの活性の比較を、Daudi細胞を標的として測定した。IgG1に比べて、IgG4PはCDC活性が顕著に低下していることがわかった(図10)。

【0107】

実施例13 抗CD40アンタゴニスティック抗体のB細胞に及ぼす影響

マウス内因性CD40破壊についてホモ接合体の遺伝子背景を有し、かつ、ヒトCD40遺伝子のトランスジーンを有しているマウス(Yasui, et al. Int. Immunol. 2002 Vol14: 319)に4D11抗体のIgG1、IgG4PおよびIgG4PEをそれぞれ100 μ g尾静脈内投与した。投与24時間後に眼窩静脈叢より採血し、0.16 mol/Lの塩化アンモニウムにて溶血後、FITC標識抗B220抗体を用い、FACSを用いて解析した。図11に結果を示す。図中縦軸は全リンパ球中のB細胞の割合を示す。B細胞割合の減弱の程度はIgG1>IgG4P>IgG4PEの順に大きかった。また、投与24時間後に脾臓を摘出し、スライドガラスですりつぶすことにより細胞浮遊液を調製した。細胞浮遊液を溶血後、PE標識抗B220抗体とFITC標識抗CD23、CD86またはCD95抗体を用い、FACSを用いて解析した。図12A,B,Cに結果を示す。図中縦軸は全リンパ球中の各表面マーカーを発現しているB細胞の割合を示す。4D11G1はいずれのマーカーも市販抗体であるマウス抗ヒトCD40アゴニスティック抗体5C3(ファーマンジェン)と同等の発現上昇がみられた。IgG4PEはIgG1およびIgG4Pに比して各活性化表面マーカーの発現上昇の程度は低かった。

【0108】

実施例14 抗CD40アンタゴニスティック抗体による抗原特異的抗体産生抑制作用およびB細胞数の変化

マウス内因性CD40破壊についてホモ接合体の遺伝子背景を有し、かつ、ヒトCD40遺伝子のトランスジーンを有しているマウス(Yasui, et al. Int. Immunol. 2002 Vol14: 319)に4-hydroxy-3-nitrophenylacetyl-chicken γ -globulin conjugates (NP-CGG: 大阪大学微生物病研究所 菊谷 仁教授より分与)とアラム(Alum: 水酸化アルミニウムゲル)の複合体を100 μ g(NP-CGG量として)腹腔内注射することにより感作した。各抗体は抗原感作直前に50または100 μ gの量を尾静脈内投与した。陰性対照として抗ヒトアルブミンヒトIgG4PE抗体100 μ gを投与した。感作7および14日後、眼窩静脈叢より採血し、血清中のNP特異的IgG1およびIgM抗体量をELISA法により測定した。ELISA法はNPを結合したウシ血清アルブミン(NP-BSA: 2.5 μ g/ml)50 μ l/ウェルを、ELISA用96穴マイクロプレート(Maxisorp, Nunc社製)の各ウェルに加え、4℃でインキュベートし、NP-BSAを吸着させた。次いで、上清を捨て、各ウェルにブロッキング試薬(スーパーブロック、Pierce社製)を加え室温でインキュベートしブロッキングした後、各ウェルを0.1%Tween20含有リン酸緩衝液(PBS-T)で3回洗浄した。次いで、各ウェルに10%ブロックエース含有PBS-Tで希釈した各血清(50 μ l/ウェル)を加え、37℃で2時間インキュベートし反応させた。マイクロプレートをPBS-Tで3回洗浄後、アルカリフォスファターゼで標識されたヤギ抗マウスIgG1抗体またはIgM抗体(コスモバイオ、1070-04または1020-04)を10%ブロックエース含有PBS-Tで1,000倍に希釈した溶液(50 μ g/ウェル)を、各ウェルに加え、37℃で2時間インキュベートした。次いで、マイクロプレートをPBS-Tで3回洗浄後、発色基質液(50 μ l/ウェル、Sigma104、phosphatase substrate)を各ウェルに加え、波長405nmでの吸光度をマイクロプレートリーダーで測定した。その結果を図13A,Bに示す。図中縦軸はNP-CGGをC57BL/6マウスに2回注射した後採血してプールした血清について、IgG1の場合は10,000倍希釈したものを、IgM抗体の場合は100倍したものをそれぞれ1ユニットとして換算した値を示す。4D11および281のIgG4PまたはIgG4PE抗体はNP特異的なIgG1およびIgM抗体産生を同等に強く抑制した。

【0109】

抗体産生抑制作用の検討に用いたマウスの末梢血中および脾臓中のB細胞数の変化を実施例1と同様の方法で測定した。その結果を図14A,Bに示す。4D11および281のIgG4P抗

体はIgG4PE抗体に比して末梢血中B細胞割合の減少がより顕著であった。また、抗原感作14日後に摘出した脾臓中B細胞の割合についてもIgG4PE抗体100 μ gの投与では変化がみられなかったのに対し、IgG4Pの投与では減少または減少傾向がみられた。

【0110】

実施例15 抗CD40アンタゴニスティック抗体のカニクイザルにおける作用

4D11のIgG4PまたはIgG4PEの30 mg/kgをカクニイザルの前腕橈側皮静脈内に投与し、一定時間後に大腿静脈より採血した。末梢血リンパ球サブセット解析は各細胞浮遊液をFITC標識抗CD3抗体、PE標識抗CD20抗体およびAPC標識抗CD45抗体を用い、FACSを用いて陽性細胞比率の計測を行い、CD45陽性細胞における比率を算出した。その結果を図15に示す。図中縦軸は抗体投与前のCD20陽性細胞比率に対する各時間でのCD20陽性細胞比率の割合を示す。IgG4P抗体投与個体では抗体投与1~7日後の間にCD20陽性細胞は約40%減少したが、IgG4PE抗体投与個体では4日後に約20%減少するのみであった。

【0111】

血清中のIL12濃度はELISA法にて測定した。大腿静脈より採取した血液を室温で20~60分間静置後、室温で3000 rpm、15分間遠心分離して得られた血清をmonkey IL12 ELISA kit (Biosource社)を用いて測定した。その結果を図16に示す。IgG4PE抗体はいずれの採血ポイントにおいてもIL12の産生増加は認められなかったが、IgG4P抗体は4日目をピークにIL12産生がみられた。

【0112】

実施例16 抗CD40アンタゴニスティック抗体のカニクイザル遅延型過敏症モデルにおける作用

テタヌス毒素 (Tetanus toxoid: TTx) (10Lf/ml; デンカ生研株式会社) を雄カニクイザル9匹に皮内及び筋肉内に感作し、TTxに対する遅延型過敏症を誘発させるとともに、感作開始の10分前に0.1及び10 mg/kg 4D11G4PE抗体の静脈内投与を各3匹に3回 (1週間毎に1回) 実施し、4D11の遅延型過敏症に対する作用を検討した。ケタミンの筋肉内投与による麻酔下で、感作は背部皮内 (50 μ L/site \times 12部位) 及び大腿部筋肉内 (0.6 mL/body) に、惹起は感作の21日後に胸部皮内 (10 μ L/site, 3カ所ずつ: 0~10Lf/ml) にTTxを投与した。惹起後24及び48時間に投与部位の皮膚反応を観察し、Draizeの皮膚障害判定基準に従い評価した。なお、TTx各濃度3カ所における結果は、それぞれを平均したものを用いた。その結果を図17に示す。4D11G4PE抗体の投与により、24及び48時間後にみられる遅延型過敏症反応は明らかに抑制された。

【0113】

TTx 特異的IgGおよびIgM抗体価に及ぼす影響を検討した。経時的に大腿静脈より採取した血液を室温で20~60分間静置後、室温で3000 rpm、15分間遠心分離して得られた血清中の抗体価をELISA法を用いて測定した。ELISA法はTTx (0.5 Lf/ml) 100 μ l/ウェルを、ELISA用96穴マイクロプレート (Maxisorp, Nunc社製) の各ウェルに加え、4℃で一晩インキュベートし、TTxを吸着させた。次いで、上清を捨て、各ウェルにブロッキング試薬 (0.5%BSA含有リン酸緩衝液) を加え室温でインキュベートしブロッキングした後、各ウェルを0.05%Tween20含有リン酸緩衝液 (PBS-T) で3回洗浄した。次いで、各ウェルに0.5%BSA含有PBS-Tで希釈した各血清 (100~819200倍希釈、希釈倍率=2; 100 μ l/ウェル) を加え、室温で2時間インキュベートし反応させた。マイクロプレートをPBS-Tで3回洗浄後、ペルオキシダーゼで標識されたヤギ抗サルIgG抗体またはIgM抗体 (Nordic Immunology) を0.5%BSA含有PBS-Tで3,000倍に希釈した溶液 (100 μ g/ウェル) を、各ウェルに加え、室温で1時間インキュベートした。次いで、マイクロプレートをPBS-Tで3回洗浄後、発色基質液 (100 μ l/ウェル、0-フェニレンジアミン塩酸塩+過酸化水素水) を各ウェルに加え、波長492nmでの吸光度をマイクロプレートリーダーで測定した。抗TTx抗体価は吸光度が0.1以上となる最大希釈倍率とし、100倍希釈においても吸光度が0.1に達しない場合は0とした。その結果を図18及び19に示す。4D11G4PE 1mg/kgの投与により、TTx特異的IgGおよびIgM抗体価は約1/10に抑制された。また、10 mg/kgの投与ではいずれの採血ポイントでも抗体価は検出感度以下であった。

【0114】

実施例 17 抗CD40アンタゴニスティック抗体の血小板血栓形成に与える影響

正常ヒトより採取した血液を4等分し(各6ml)、それぞれ100 μ g/mlの濃度となるようにコントロールヒトIgG4PE, コントロールマウスIgG2a, ヒト抗ヒトCD40 IgG4PE (4D11), マウス抗ヒトCD154 IgG2a (5C8)を加え37℃で10分間インキュベートした。Flat perfusion chamber (Glycotech社)およびコラーゲンコートペトリデッシュを付属の説明書に従い組み立て、そのチャンバーに各種抗体で処理した血液を1500/sのずり応力が加わる速度で7分間流した。その後4%パラホルムアルデヒドリン酸緩衝液を同じく1500/sのずり応力が加わる速度で10分間流し、ペトリデッシュ上に形成された血小板凝集塊を固定し、さらに血小板特異的PE標識抗CD41a抗体で染色したうえ蛍光顕微鏡で観察した。その結果を図20A,Bに示す。ヒト抗ヒトCD40 IgG4PE (4D11)で処理した血液は、コントロール抗体で処理した血液と同様に、コラーゲンコートペトリデッシュ上に血小板凝集塊を形成したが、マウス抗ヒトCD154 IgG2aで処理した血液は血小板凝集塊を形成しなかった。

【0115】

実施例 18 抗CD40アンタゴニスティック抗体の安定性の評価

4D11抗体の定常領域改変抗体の安定性を比較検討した。方法としてはG4P、G4PE、G2SerおよびG4/2/4をHEK293細胞で一過性発現することにより得られた培養上清をProtein Aカラム(アマシャムバイオサイエンス社)にチャージし0.1Mクエン酸バッファー(pH2.7)により溶出した後37℃で1分間および10分間インキュベートした。その後50mMリン酸バッファー(pH7.0)により中和した。得られた抗体溶液のオリゴマー含有率をゲルろ過カラム(東ソー社)を用いて測定した。その結果インキュベート時間に応じてオリゴマー含有率が増加し、G4/2/4>G4PE>G2Ser>G4Pの順にオリゴマーが生成しやすいことが判明した(図21)。

【図面の簡単な説明】

【0116】

【図1A-1】図1A-1は、抗CD40アゴニスト抗体のCD40を配列を基に作製したペプチドへの結合部位を示した図である。

【図1A-2】図1A-2は、抗CD40アゴニスト抗体のCD40を配列を基に作製したペプチドへの結合部位を示した図である(図1A-1の続き)。

【図1B-1】図1B-1は、抗CD40アンタゴニスト抗体のCD40を配列を基に作製したペプチドへの結合部位を示した図である。

【図1B-2】図1B-2は、抗CD40アンタゴニスト抗体のCD40を配列を基に作製したペプチドへの結合部位を示した図である(図1B-1の続き)。

【図2A】図2Aは、変異CD40に対する抗CD40抗体の結合性を示した図である。

【図2B】図2Bは、変異CD40に対する抗CD40抗体の結合性を示した図である。

【図2C】図2Cは、変異CD40に対する抗CD40抗体の結合性を示した図である。

【図3A】図3Aは、KM341-1-19にP331Sの変異を導入しても、Ramos細胞への結合活性が同程度あることを示した図である。

【図3B】図3Bは、KM341-1-19にP331Sの変異を導入しても、Ramos細胞へのCD95発現促進活性が同程度あることを示す図である。

【図4A】図4Aは、KM341-1-19にP331Sの変異を導入すると、ウサギ補体を使ったCDC活性が抑制されることを示す図である。

【図4B】図4Bは、ヒト補体を使った場合、G2/4が低い補体活性があることを示す図である。

【図5A-1】図5A-1は、2105のサブクラスをIgG2から他のサブクラスへ変換した場合、Ramos細胞への結合は変化しないことを示す図である。

【図5A-2】図5A-2は、KM341-1-19のサブクラスをIgG2から他のサブクラスへ変換した場合、Ramos細胞への結合は変化しないことを示す図である。

【図5B-1】図5B-1は、2105のサブクラスをIgG2から他のサブクラスへ変換した場合、Ramos細胞へのCD95発現促進活性が低下することを示す図である。

【図 5 B - 2】図 5 B-2は、KM341-1-19のサブクラスをIgG 2 から他のサブクラスへ変換した場合、Ramos細胞へのCD9 5 発現促進活性が低下することを示す図である。

【図 6 A - 1】図 6 A-1は、KM341-1-19のRamos細胞への結合能は、ヒンジの構造に依存されないことを示す図である。

【図 6 A - 2】図 6 A-2は、2105のRamos細胞への結合能は、ヒンジの構造に依存されないことを示す図である。

【図 6 B - 1】図 6 B-1は、KM341-1-19のRamos細胞へのCD9 5 発現促進活性は、アッパーヒンジ、ミドルヒンジが重要であることを示す図である。

【図 6 B - 2】図 6 B-2は、2105のRamos細胞へのCD9 5 発現促進活性は、アッパーヒンジ、ミドルヒンジが重要であることを示す図である。

【図 7 A】図 7 Aは、F72をIgG2サブクラスに変換すると、Ramos細胞への結合能は変化しないことを示す図である。

【図 7 B】図 7 Bは、F72をIgG2サブクラスに変換すると、CD9 5 発現促進活性は上昇することを示す図である。

【図 8 A】図 8 Aは、4 D11のサブクラスをIgG 1 からIgG4へ変換した場合、Ramos細胞への結合は変化しないことを示す図である。

【図 8 B】図 8 Bは、4 D11のサブクラスをIgG 1 からIgG4へ変換した場合、CD40Ligand によるRamos細胞におけるCD95の発現上昇を同程度阻害することを示す図である。

【図 9】図 9 は、4 D11のサブクラスをIgG 1 からIgG4、IgG4PEに換えた場合、ADCC活性が低減したことを示す図である。

【図 1 0】図10は、4 D11のサブクラスをIgG 1 からIgG4Pへ換えた場合、CDC活性が低減したことを示す図である。

【図 1 1】図 1 1 は、4 D11G1、4 D11G4P、4 D11G4PEをhuman CD40トランスジェニックマウスに投与した後の、血中B細胞数の変化を示す図である。

【図 1 2 A】図 1 2 Aは、抗CD40抗体をhuman CD40トランスジェニックマウスに投与した後の、脾臓B細胞のCD23の発現上昇を示す図である。

【図 1 2 B】図 1 2 Bは、抗CD40抗体をhuman CD40トランスジェニックマウスに投与した後の、脾臓B細胞のCD86の発現上昇を示す図である。

【図 1 2 C】図 1 2 Cは、抗CD40抗体をhuman CD40トランスジェニックマウスに投与した後の、脾臓B細胞のCD95の発現上昇を示す図である。

【図 1 3 A】図13Aは、human CD40トランスジェニックマウス 4 D11, 281-1-10による抗原特異的抗体 (IgG1) 産生抑制活性を示す図である。

【図 1 3 B】図13Bは、human CD40トランスジェニックマウス 4 D11, 281-1-10による抗原特異的抗体 (IgM) 産生抑制活性を示す図である。

【図 1 4 A】図14Aは、抗原特異的抗体産生抑制活性試験時の血中B細胞数を示す図である。

【図 1 4 B】図14Bは、抗原特異的抗体産生抑制活性試験時の脾臓中B細胞数を示す図である。

【図 1 5】図15は、カニクイザルに30mg/kgの4D11G4P、4D11G4PEを投与した場合の血中B細胞数の変化を示す図である。

【図 1 6】図16は、図15試験時の血中IL-12濃度を示す図である。

【図 1 7】図17は、4 D11G4PEのサルDTH抑制効果を示す図である。

【図 1 8】図18は、図17試験における抗テタヌストキシンIgGの力値を示す図である。

。

【図 1 9】図19は、図17試験における抗テタヌストキシンIgMの力値をしめす。

【図 2 0 A】図20Aは、4 D11G4PEと 5 C8 (抗CD40Ligand抗体) の血小板凝集に対する影響を示す図である。

【図 2 0 B】図20Bは、4 D11G4PEと 5 C8 (抗CD40Ligand抗体) の血小板凝集に対する影響を示す図である。

【図 2 1】図21は、4 D11G4P、4 D11G4PE、4D11G2Ser、4D11G4/2/4を pH2. 7、37度

でインキュベートした後の、オリゴマー含有率の変化を示す図である。

【配列表フリーテキスト】

【 0 1 1 7 】

配列番号 2 から 3 6 : 合成DNA

配列番号 4 9 から 1 3 0 : 合成ペプチド

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> KIRIN BEER KABUSIKI KAISHA

<120> A mutant of anti CD40 antibody

<130> P03-1165

<140>

<141>

<160> 130

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 175

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Glu Pro Pro Thr Ala Cys Arg Glu Lys Gln Tyr Leu Ile Asn Ser Gln
 1 5 10 15

Cys Cys Ser Leu Cys Gln Pro Gly Gln Lys Leu Val Ser Asp Cys Thr
 20 25 30

Glu Phe Thr Glu Thr Glu Cys Leu Pro Cys Gly Glu Ser Glu Phe Leu
 35 40 45

Asp Thr Trp Asn Arg Glu Thr His Cys His Gln His Lys Tyr Cys Asp
 50 55 60

Pro Asn Leu Gly Leu Arg Val Gln Gln Lys Gly Thr Ser Glu Thr Asp
 65 70 75 80

Thr Ile Cys Thr Cys Glu Glu Gly Trp His Cys Thr Ser Glu Ala Cys
 85 90 95

Glu Ser Cys Val Leu His Arg Ser Cys Ser Pro Gly Phe Gly Val Lys
 100 105 110

Gln Ile Ala Thr Gly Val Ser Asp Thr Ile Cys Glu Pro Cys Pro Val
 115 120 125

Gly Phe Phe Ser Asn Val Ser Ser Ala Phe Glu Lys Cys His Pro Trp
 130 135 140

Thr Ser Cys Glu Thr Lys Asp Leu Val Val Gln Gln Ala Gly Thr Asn

145 150 155 160
Lys Thr Asp Val Val Cys Gly Pro Gln Asp Arg Leu Arg Ala Leu
 165 170 175

<210> 2
<211> 39
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

<400> 2
atatgctagc accaagggcc catcgtctt cccctggc 39

<210> 3
<211> 38
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

<400> 3
atatgatcc tcattaccc ggagacaggg agaggctc 38

<210> 4
<211> 40
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

<400> 4
atatgctagc accaagggcc catcgtctt cccctggcg 40

<210> 5
<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

<400> 5
gttttctcga tggaggctgg gaggcc

26

<210> 6
<211> 38
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

<400> 6
atatggatcc tcatttaccc ggagacaggg agaggctc

38

<210> 7
<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

<400> 7
ggcctcccag cctccatcga gaaaac

26

<210> 8
<211> 36
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

<400> 8
atatggatcc tcatttaccc ggagacaggg agaggc

36

<210> 9
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

<400> 9
agggggtccgg gagatcatga gagtgtcctt

30

<210> 10
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

<400> 10
aaggacactc tcatgatctc ccggaccct

30

<210> 11
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

<400> 11
tgatcatacg tagatatcac ggc

23

<210> 12
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

<400> 12
tgatcatacg tagatatcac ggc

23

<210> 13
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

<400> 13
gggtacgtcc tcacattcag tgatcag

27

<210> 14
<211> 39
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

<400> 14
tttgcgtca actgtcttgt ccaccttggg gttgctggg 39

<210> 15
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

<400> 15
tgatcatacg tagatatcac ggc 23

<210> 16
<211> 36
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

<400> 16
acagttgagc gcaaattgtg tgtcgagtgc ccaccg 36

<210> 17
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

<400> 17
gggtacgtcc tcacattcag tgatcag 27

<210> 18
<211> 31

<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

<400> 18
ggtgttgctg ggcttggat ctacgttgca g 31

<210> 19
<211> 31
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

<400> 19
ctgcaacgta gatcacaagc ccagcaacac c 31

<210> 20
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

<400> 20
tgatcatacg tagatatcac ggc 23

<210> 21
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

<400> 21
gggtacgtcc tcacattcag tgatcag 27

<210> 22
<211> 31
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

<400> 22

gggtgttgctg ggcttgtgat ctacgttgca g

31

<210> 23

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

<400> 23

ctgcaacgta gatcacaagc ccagcaacac c

31

<210> 24

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

<400> 24

tgatcatacg tagatatcac ggc

23

<210> 25

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

<400> 25

gggtacgtcc tcacattcag tgatcag

27

<210> 26

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

<400> 26

cacaacattt ggactcaact ctcttgtcca cc

32

<210> 27

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

<400> 27

ggtggacaag agagttgagt ccaaattgtg tg

32

<210> 28

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

<400> 28

tgatcatacg tagatatcac ggc

23

<210> 29

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

<400> 29

gggtacgtcc tcacattcag tgatcag

27

<210> 30

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

<400> 30
ggcacggtgg gcatggggga ccatatttgc gctc 34

<210> 31
<211> 34
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

<400> 31
gagcgcaa atgtgtcccc atgtccaccg tgcc 34

<210> 32
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

<400> 32
tgatcatacg tagatatcac ggc 23

<210> 33
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

<400> 33
gggtacgtcc tcacattcag tgatcag 27

<210> 34
<211> 39
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

<400> 34
gaagactgac ggtccccca ggaactctgg tgctgggca 39

<210> 35
<211> 39
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

<400> 35
tgcccagcac cagagttcct ggggggaccg tcagtcttc

39

<210> 36
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

<400> 36
tgatcatacg tagatatcac ggc

23

<210> 37
<211> 1480
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 37
gtcgacgctg aattctggct gaccagggca gccaccagag ctccagacaa tgtctgtctc 60
cttcctcatc ttcctgcccg tgctgggcct cccatgggggt gtcctgtcac aggtccaact 120
gcagcagtca ggtccaggac tggatgaagcc ctccgagacc ctctcactca cctgtgccat 180
ctccggggac agtgtctcta gcaacagtgc tacttggaac tggatcaggc agtccccatc 240
gagagacctt gagtggctgg gaaggacata ctacaggtcc aagtggatc gtgattatgt 300
aggatctgtg aaaagtcgaa taatcatcaa cccagacaca tccaacaacc agttctccct 360
gcagctgaac tctgtgactc ccgaggacac ggctatatat tactgtacaa gagcacagtg 420
gctggggagg gattaccctt actactacag tatggacgtc tggggccaag ggaccacggg 480
caccgtctct tcagcctcca ccaagggccc atcgggtctt cccctggcgc cctgtccag 540
gagcacctcc gagagcacag cggccctggg ctgcctggte aaggactact tccccgaacc 600
ggtgacgggt tcgtggaact caggcgtctt gaccagcggc gtgcacacct tcccagctgt 660
cctacagtcc tcaggactct actccctcag cagcgtggtg accgtgccct ccagcaactt 720
cggcaccag acctacacct gcaacgtaga tcacaagccc agcaacacca aggtggacaa 780
gacagttgag cgcaaatgtt gtgtcgagtg cccaccgtgc ccagcaccac ctgtggcagg 840
accgtcagtc ttcctcttcc ccccaaaacc caaggacacc ctcatgatct cccggacccc 900
tgaggtcacg tgcgtggtgg tggacgtgag ccacgaagac cccgaggtcc agttcaactg 960
gtacgtggac ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag ccacgggagg agcagttcaa 1020
cagcacgttc cgtgtggtca gcgtcctcac cgttgtgcac caggactggc tgaacggcaa 1080

ggagtacaag tgcaaggtct ccaacaaagg cctcccagcc cccatcgaga aaaccatctc 1140
 caaaaccaa gggcagcccc gagaaccaca ggtgtacacc ctgcccccat cccgggagga 1200
 gatgaccaag aaccagggtca gcctgacctg cctgggtcaaa ggcttctacc ccagcgacat 1260
 cgccgtggag tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca cacctcccat 1320
 gctggactca gacggctcct tcttctctta cagcaagctc accgtggaca agagcagggtg 1380
 gcagcagggg aacgtcttct catgctccgt gatgcatgag gctctgcaca accactacac 1440
 gcagaagagc ctctccctgt ctccgggtaa atgaggatcc 1480

<210> 38

<211> 474

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 38

Met Ser Val Ser Phe Leu Ile Phe Leu Pro Val Leu Gly Leu Pro Trp
 1 5 10 15

Gly Val Leu Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val
 20 25 30

Lys Pro Ser Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Ile Ser Gly Asp Ser
 35 40 45

Val Ser Ser Asn Ser Ala Thr Trp Asn Trp Ile Arg Gln Ser Pro Ser
 50 55 60

Arg Asp Leu Glu Trp Leu Gly Arg Thr Tyr Tyr Arg Ser Lys Trp Tyr
 65 70 75 80

Arg Asp Tyr Val Gly Ser Val Lys Ser Arg Ile Ile Ile Asn Pro Asp
 85 90 95

Thr Ser Asn Asn Gln Phe Ser Leu Gln Leu Asn Ser Val Thr Pro Glu
 100 105 110

Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Thr Arg Ala Gln Trp Leu Gly Gly Asp
 115 120 125

Tyr Pro Tyr Tyr Tyr Ser Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val
 130 135 140

Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala
 145 150 155 160

Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu
 165 170 175

Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly
 180 185 190

Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser
195 200 205

Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe
210 215 220

Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr
225 230 235 240

Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro
245 250 255

Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
260 265 270

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
275 280 285

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp
290 295 300

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
305 310 315 320

Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val
325 330 335

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
340 345 350

Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly
355 360 365

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
370 375 380

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
385 390 395 400

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
405 410 415

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
420 425 430

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
435 440 445

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr

450

455

460

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

465

470

<210> 39

<211> 406

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 39

actgctcagt taggacccag aggggaacat ggaagcccca gctcagcttc tcttcctcct 60
 gctactctgg ctcccagata ccaccggaga aattgtgttg acacagtctc cagccaccct 120
 gtctttgtct ccaggggaaa gagccaccct ctcctgcagg gccagtcaga gtgtttagcag 180
 ctacttagcc tggtagcaaac agaaacctgg ccaggctccc aggctcctca tctatgatgc 240
 atccaacagg gccactggca tcccagccag gttcagtggc agtgggtctg ggacagactt 300
 cactctcacc atcagcagcc tagagcctga agattttgca gtttattact gtcagcagcg 360
 tagcaacact ttcggccctg ggaccaaagt ggatatcaaa cgtacg 406

<210> 40

<211> 126

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 40

Met Glu Ala Pro Ala Gln Leu Leu Phe Leu Leu Leu Leu Trp Leu Pro
 1 5 10 15

Asp Thr Thr Gly Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser
 20 25 30

Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser
 35 40 45

Val Ser Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro
 50 55 60

Arg Leu Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala
 65 70 75 80

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
 85 90 95

Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser
 100 105 110

Asn Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys Arg Thr
 115 120 125

<210> 41
 <211> 508
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 41
 ctgaacacag acccgctgac tcccaggtgt ttccattcag tgatcagcac tgaacacaga 60
 ggactcacca tggagttggg actgagctgg attttccttt tggctatattt aaaaggtgtc 120
 cagtgtgaag tgcagctggt ggagtctggg ggaggcttgg tacagcctgg caggtccttg 180
 agactctcct gtgcagcctc tggattcacc ttgatgatt atgccatgca ctgggtccgg 240
 caagctccag ggaagggcct ggagtgggtc tcaggtatta gttggaatag tggtagcttg 300
 gtgcatgcgg actctgtgaa gggccgattc accatctcca gagacaacgc caagaactcc 360
 ctgtatctgc aaatgaacag tctgagagct gaggacacgg ccttgtatta ctgtgcaaga 420
 gataggctat ttcggggagt taggtactac ggtatggacg tctggggcca agggaccacg 480
 gtcaccgtct cctcagctag caccaagg 508

<210> 42
 <211> 146
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 42
 Met Glu Leu Gly Leu Ser Trp Ile Phe Leu Leu Ala Ile Leu Lys Gly
 1 5 10 15
 Val Gln Cys Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
 20 25 30
 Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
 35 40 45
 Asp Asp Tyr Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 50 55 60
 Glu Trp Val Ser Gly Ile Ser Trp Asn Ser Gly Ser Leu Val His Ala
 65 70 75 80
 Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn
 85 90 95
 Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Leu
 100 105 110
 Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Arg Leu Phe Arg Gly Val Arg Tyr Tyr Gly
 115 120 125
 Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser

130

135

140

Thr Lys

145

<210> 43

<211> 414

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 43

```

ctgctcagtt aggacccaga gggaaccatg gaagccccag ctcagcttct cttcctcctg 60
ctactctggc tcccagatac caccggagaa attgtgttga cacagtctcc agccaccctg 120
tctttgtctc caggggaaag agccaccctc tcctgcaggg ccagtcagag tgttagcagc 180
tacttagcct ggtaccaaca gaaacctggc caggctccca ggctcctcat ctatgatgca 240
tccaacaggg ccactggcat cccagccagg ttcagtggca gtgggtcttg gacagacttc 300
actctcacca tcagcagcct agagcctgaa gatatttgag tttattactg tcagcagcgt 360
agccactggc tcactttcgg cgggggggacc aaggtggaga tcaaacgtac ggtg      414

```

<210> 44

<211> 129

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 44

```

Met Glu Ala Pro Ala Gln Leu Leu Phe Leu Leu Leu Leu Trp Leu Pro
  1                      5                      10                      15

```

```

Asp Thr Thr Gly Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser
          20                      25                      30

```

```

Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser
          35                      40                      45

```

```

Val Ser Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro
          50                      55                      60

```

```

Arg Leu Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala
        65                      70                      75                      80

```

```

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
          85                      90                      95

```

```

Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser
          100                      105                      110

```

```

His Trp Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr
          115                      120                      125

```

Val

<210> 45
 <211> 462
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 45
 atatgtcgac gagtcattgga tctcatgtgc aagaaaatga agcacctgtg gttcttcctc 60
 ctgctggtgg cggctcccag atgggtcctg tcccagctgc agctgcagga gtcgggccc 120
 ggactactga agccttcgga gaccctgtcc ctcacctgca ctgtctctgg cggctccatc 180
 agcagtcctg gttactacgg gggctggatc cgccagcccc cagggaaggg gctggagtgg 240
 attgggagta tctataaaag tgggagcacc taccacaacc cgtccctcaa gagtcgagtc 300
 accatatccg tagacacgtc caagaaccag ttctccctga agctgagctc tgtgaccgcc 360
 gcagacacgg ctgtgtatta ctgtacgaga cctgtagtac gatattttgg gtggttcgac 420
 ccctggggcc agggaaccct ggtcacgcgc tcctcagcta gc 462

<210> 46
 <211> 149
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 46
 Met Asp Leu Met Cys Lys Lys Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu
 1 5 10 15
 Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp Val Leu Ser Gln Leu Gln Leu Gln Glu
 20 25 30
 Ser Gly Pro Gly Leu Leu Lys Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys
 35 40 45
 Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Pro Gly Tyr Tyr Gly Gly Trp
 50 55 60
 Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly Ser Ile Tyr
 65 70 75 80
 Lys Ser Gly Ser Thr Tyr His Asn Pro Ser Leu Lys Ser Arg Val Thr
 85 90 95
 Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Lys Leu Ser Ser
 100 105 110
 Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Arg Pro Val Val
 115 120 125

Arg Tyr Phe Gly Trp Phe Asp Pro Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
 130 135 140

Val Ser Ser Ala Ser
 145

<210> 47
 <211> 448
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 47
 agatcttaag caagtgtaac aactcagagt acgcggggag acccactcag gacacagcat 60
 ggacatgagg gtccccgctc agctcctggg gcttctgctg ctctggctcc caggtgccag 120
 atgtgccatc cagttgaccc agtctccatc ctccctgtct gcactgttag gagacagagt 180
 caccatcact tgccggggcaa gtcagggcat tagcagtgtt ttagcctggt atcagcagaa 240
 accagggaaa gtccttaagc tcctgatcta tgatgcctcc aatttgaaa gtgggggtccc 300
 atcaagggtc agcggcagtg gatctgggac agatttcact ctcaccatca gcagcctgca 360
 gcctgaagat tttgcaactt attactgtca acagtttaat agttaccga cgttcggcca 420
 agggaccaag gtggaaatca aacgtacg 448

<210> 48
 <211> 130
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 48
 Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp
 1 5 10 15

Leu Pro Gly Ala Arg Cys Ala Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser
 20 25 30

Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser
 35 40 45

Gln Gly Ile Ser Ser Ala Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys
 50 55 60

Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val
 65 70 75 80

Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
 85 90 95

Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
 100 105 110

Phe Asn Ser Tyr Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
115 120 125

Arg Thr
130

<210> 49
<211> 13
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic
peptide

<400> 49
Glu Pro Pro Thr Ala Cys Arg Glu Lys Gln Tyr Leu Ile
1 5 10

<210> 50
<211> 13
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic
peptide

<400> 50
Pro Thr Ala Cys Arg Glu Lys Gln Tyr Leu Ile Asn Ser
1 5 10

<210> 51
<211> 13
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic
peptide

<400> 51
Ala Cys Arg Glu Lys Gln Tyr Leu Ile Asn Ser Gln Cys
1 5 10

<210> 52
<211> 13
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic
peptide

<400> 52
Arg Glu Lys Gln Tyr Leu Ile Asn Ser Gln Cys Cys Ser
1 5 10

<210> 53
<211> 13
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic
peptide

<400> 53
Lys Gln Tyr Leu Ile Asn Ser Gln Cys Cys Ser Leu Cys
1 5 10

<210> 54
<211> 13
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic
peptide

<400> 54
Tyr Leu Ile Asn Ser Gln Cys Cys Ser Leu Cys Gln Pro
1 5 10

<210> 55
<211> 13
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic
peptide

<400> 55

Ile Asn Ser Gln Cys Cys Ser Leu Cys Gln Pro Gly Gln
1 5 10

<210> 56

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic peptide

<400> 56

Ser Gln Cys Cys Ser Leu Cys Gln Pro Gly Gln Lys Leu
1 5 10

<210> 57

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic peptide

<400> 57

Cys Cys Ser Leu Cys Gln Pro Gly Gln Lys Leu Val Ser
1 5 10

<210> 58

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic peptide

<400> 58

Ser Leu Cys Gln Pro Gly Gln Lys Leu Val Ser Asp Cys
1 5 10

<210> 59

<211> 13

<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic
peptide

<400> 59
Cys Gln Pro Gly Gln Lys Leu Val Ser Asp Cys Thr Glu
1 5 10

<210> 60
<211> 13
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic
peptide

<400> 60
Pro Gly Gln Lys Leu Val Ser Asp Cys Thr Glu Phe Thr
1 5 10

<210> 61
<211> 13
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic
peptide

<400> 61
Gln Lys Leu Val Ser Asp Cys Thr Glu Phe Thr Glu Thr
1 5 10

<210> 62
<211> 13
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic
peptide

<400> 62

Leu Val Ser Asp Cys Thr Glu Phe Thr Glu Thr Glu Cys
1 5 10

<210> 63
<211> 13
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic
peptide

<400> 63
Ser Asp Cys Thr Glu Phe Thr Glu Thr Glu Cys Leu Pro
1 5 10

<210> 64
<211> 13
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic
peptide

<400> 64
Cys Thr Glu Phe Thr Glu Thr Glu Cys Leu Pro Cys Gly
1 5 10

<210> 65
<211> 13
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic
peptide

<400> 65
Glu Phe Thr Glu Thr Glu Cys Leu Pro Cys Gly Glu Ser
1 5 10

<210> 66
<211> 13
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic peptide

<400> 66

Thr	Glu	Thr	Glu	Cys	Leu	Pro	Cys	Gly	Glu	Ser	Glu	Phe
1				5					10			

<210> 67

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic peptide

<400> 67

Thr	Glu	Cys	Leu	Pro	Cys	Gly	Glu	Ser	Glu	Phe	Leu	Asp
1				5					10			

<210> 68

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic peptide

<400> 68

Cys	Leu	Pro	Cys	Gly	Glu	Ser	Glu	Phe	Leu	Asp	Thr	Trp
1				5					10			

<210> 69

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic peptide

<400> 69

Pro	Cys	Gly	Glu	Ser	Glu	Phe	Leu	Asp	Thr	Trp	Asn	Arg
1				5					10			

<210> 70
<211> 13
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic
peptide

<400> 70
Gly Glu Ser Glu Phe Leu Asp Thr Trp Asn Arg Glu Thr
1 5 10

<210> 71
<211> 13
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic
peptide

<400> 71
Ser Glu Phe Leu Asp Thr Trp Asn Arg Glu Thr His Cys
1 5 10

<210> 72
<211> 13
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic
peptide

<400> 72
Phe Leu Asp Thr Trp Asn Arg Glu Thr His Cys His Gln
1 5 10

<210> 73
<211> 13
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic peptide

<400> 73

Asp Thr Trp Asn Arg Glu Thr His Cys His Gln His Lys
1 5 10

<210> 74

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic peptide

<400> 74

Trp Asn Arg Glu Thr His Cys His Gln His Lys Tyr Cys
1 5 10

<210> 75

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic peptide

<400> 75

Arg Glu Thr His Cys His Gln His Lys Tyr Cys Asp Pro
1 5 10

<210> 76

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic peptide

<400> 76

Thr His Cys His Gln His Lys Tyr Cys Asp Pro Asn Leu
1 5 10

<210> 77
<211> 13
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic
peptide

<400> 77
Cys His Gln His Lys Tyr Cys Asp Pro Asn Leu Gly Leu
1 5 10

<210> 78
<211> 13
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic
peptide

<400> 78
Gln His Lys Tyr Cys Asp Pro Asn Leu Gly Leu Arg Val
1 5 10

<210> 79
<211> 13
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic
peptide

<400> 79
Lys Tyr Cys Asp Pro Asn Leu Gly Leu Arg Val Gln Gln
1 5 10

<210> 80
<211> 13
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic
peptide

<400> 80

Cys Asp Pro Asn Leu Gly Leu Arg Val Gln Gln Lys Gly
1 5 10

<210> 81

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic
peptide

<400> 81

Pro Asn Leu Gly Leu Arg Val Gln Gln Lys Gly Thr Ser
1 5 10

<210> 82

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic
peptide

<400> 82

Leu Gly Leu Arg Val Gln Gln Lys Gly Thr Ser Glu Thr
1 5 10

<210> 83

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic
peptide

<400> 83

Leu Arg Val Gln Gln Lys Gly Thr Ser Glu Thr Asp Thr
1 5 10

<210> 84

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic peptide

<400> 84

Val Gln Gln Lys Gly Thr Ser Glu Thr Asp Thr Ile Cys
1 5 10

<210> 85

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic peptide

<400> 85

Gln Lys Gly Thr Ser Glu Thr Asp Thr Ile Cys Thr Cys
1 5 10

<210> 86

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic peptide

<400> 86

Gly Thr Ser Glu Thr Asp Thr Ile Cys Thr Cys Glu Glu
1 5 10

<210> 87

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic peptide

<400> 87

Ser Glu Thr Asp Thr Ile Cys Thr Cys Glu Glu Gly Trp
1 5 10

<210> 88
<211> 13
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic
peptide

<400> 88
Thr Asp Thr Ile Cys Thr Cys Glu Glu Gly Trp His Cys
1 5 10

<210> 89
<211> 13
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic
peptide

<400> 89
Thr Ile Cys Thr Cys Glu Glu Gly Trp His Cys Thr Ser
1 5 10

<210> 90
<211> 13
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic
peptide

<400> 90
Cys Thr Cys Glu Glu Gly Trp His Cys Thr Ser Glu Ala
1 5 10

<210> 91
<211> 13
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic
peptide

<400> 91

Cys Glu Glu Gly Trp His Cys Thr Ser Glu Ala Cys Glu
1 5 10

<210> 92

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic
peptide

<400> 92

Glu Gly Trp His Cys Thr Ser Glu Ala Cys Glu Ser Cys
1 5 10

<210> 93

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic
peptide

<400> 93

Trp His Cys Thr Ser Glu Ala Cys Glu Ser Cys Val Leu
1 5 10

<210> 94

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic
peptide

<400> 94

Cys Thr Ser Glu Ala Cys Glu Ser Cys Val Leu His Arg
1 5 10

<210> 95
<211> 13
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic
peptide

<400> 95
Ser Glu Ala Cys Glu Ser Cys Val Leu His Arg Ser Cys
1 5 10

<210> 96
<211> 13
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic
peptide

<400> 96
Ala Cys Glu Ser Cys Val Leu His Arg Ser Cys Ser Pro
1 5 10

<210> 97
<211> 13
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic
peptide

<400> 97
Glu Ser Cys Val Leu His Arg Ser Cys Ser Pro Gly Phe
1 5 10

<210> 98
<211> 13
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic peptide

<400> 98

Cys Val Leu His Arg Ser Cys Ser Pro Gly Phe Gly Val
1 5 10

<210> 99

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic peptide

<400> 99

Leu His Arg Ser Cys Ser Pro Gly Phe Gly Val Lys Gln
1 5 10

<210> 100

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic peptide

<400> 100

Arg Ser Cys Ser Pro Gly Phe Gly Val Lys Gln Ile Ala
1 5 10

<210> 101

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic peptide

<400> 101

Cys Ser Pro Gly Phe Gly Val Lys Gln Ile Ala Thr Gly
1 5 10

<210> 102
<211> 13
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic
peptide

<400> 102
Pro Gly Phe Gly Val Lys Gln Ile Ala Thr Gly Val Ser
1 5 10

<210> 103
<211> 13
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic
peptide

<400> 103
Phe Gly Val Lys Gln Ile Ala Thr Gly Val Ser Asp Thr
1 5 10

<210> 104
<211> 13
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic
peptide

<400> 104
Val Lys Gln Ile Ala Thr Gly Val Ser Asp Thr Ile Cys
1 5 10

<210> 105
<211> 13
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic
peptide

<400> 105

Gln Ile Ala Thr Gly Val Ser Asp Thr Ile Cys Glu Pro
1 5 10

<210> 106

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic peptide

<400> 106

Ala Thr Gly Val Ser Asp Thr Ile Cys Glu Pro Cys Pro
1 5 10

<210> 107

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic peptide

<400> 107

Gly Val Ser Asp Thr Ile Cys Glu Pro Cys Pro Val Gly
1 5 10

<210> 108

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic peptide

<400> 108

Ser Asp Thr Ile Cys Glu Pro Cys Pro Val Gly Phe Phe
1 5 10

<210> 109

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic peptide

<400> 109

Thr	Ile	Cys	Glu	Pro	Cys	Pro	Val	Gly	Phe	Phe	Ser	Asn
1				5				10				

<210> 110

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic peptide

<400> 110

Cys	Glu	Pro	Cys	Pro	Val	Gly	Phe	Phe	Ser	Asn	Val	Ser
1				5					10			

<210> 111

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic peptide

<400> 111

Pro	Cys	Pro	Val	Gly	Phe	Phe	Ser	Asn	Val	Ser	Ser	Ala
1				5				10				

<210> 112

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic peptide

<400> 112

Pro Val Gly Phe Phe Ser Asn Val Ser Ser Ala Phe Glu
1 5 10

<210> 113
<211> 13
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic
peptide

<400> 113
Gly Phe Phe Ser Asn Val Ser Ser Ala Phe Glu Lys Cys
1 5 10

<210> 114
<211> 13
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic
peptide

<400> 114
Phe Ser Asn Val Ser Ser Ala Phe Glu Lys Cys His Pro
1 5 10

<210> 115
<211> 13
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic
peptide

<400> 115
Asn Val Ser Ser Ala Phe Glu Lys Cys His Pro Trp Thr
1 5 10

<210> 116
<211> 13
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic peptide

<400> 116

Ser	Ser	Ala	Phe	Glu	Lys	Cys	His	Pro	Trp	Thr	Ser	Cys
1				5					10			

<210> 117

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic peptide

<400> 117

Ala	Phe	Glu	Lys	Cys	His	Pro	Trp	Thr	Ser	Cys	Glu	Thr
1				5					10			

<210> 118

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic peptide

<400> 118

Glu	Lys	Cys	His	Pro	Trp	Thr	Ser	Cys	Glu	Thr	Lys	Asp
1				5					10			

<210> 119

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic peptide

<400> 119

Cys	His	Pro	Trp	Thr	Ser	Cys	Glu	Thr	Lys	Asp	Leu	Val
1				5					10			

<210> 120
<211> 13
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic
peptide

<400> 120
Pro Trp Thr Ser Cys Glu Thr Lys Asp Leu Val Val Gln
1 5 10

<210> 121
<211> 13
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic
peptide

<400> 121
Thr Ser Cys Glu Thr Lys Asp Leu Val Val Gln Gln Ala
1 5 10

<210> 122
<211> 13
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic
peptide

<400> 122
Cys Glu Thr Lys Asp Leu Val Val Gln Gln Ala Gly Thr
1 5 10

<210> 123
<211> 13
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic peptide

<400> 123

Thr Lys Asp Leu Val Val Gln Gln Ala Gly Thr Asn Lys
1 5 10

<210> 124

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic peptide

<400> 124

Asp Leu Val Val Gln Gln Ala Gly Thr Asn Lys Thr Asp
1 5 10

<210> 125

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic peptide

<400> 125

Val Val Gln Gln Ala Gly Thr Asn Lys Thr Asp Val Val
1 5 10

<210> 126

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic peptide

<400> 126

Gln Gln Ala Gly Thr Asn Lys Thr Asp Val Val Cys Gly
1 5 10

<210> 127
<211> 13
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic
peptide

<400> 127
Ala Gly Thr Asn Lys Thr Asp Val Val Cys Gly Pro Gln
1 5 10

<210> 128
<211> 13
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic
peptide

<400> 128
Thr Asn Lys Thr Asp Val Val Cys Gly Pro Gln Asp Arg
1 5 10

<210> 129
<211> 13
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic
peptide

<400> 129
Lys Thr Asp Val Val Cys Gly Pro Gln Asp Arg Leu Arg
1 5 10

<210> 130
<211> 13
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic
peptide

<400> 130

Asp Val Val Cys Gly Pro Gln Asp Arg Leu Arg Ala Leu
1 5 10

【書類名】 図面

【図 1 A-1】

配列	2105	KM643-4-11	F2-103	110	KM341-1-19
1. EPPTACREKQYLI	16353	13220	31427	13403	14108
2. PTACREKQYLINS	17358	13220	39202	13575	14194
3. ACREKQYLINSQC	20267	13212	35911	13681	14013
4. REKQYLINSQCCS	17096	13305	43762	13685	13952
5. KQYLINSQCCSLC	23249	13292	36839	13894	13779
6. YLINSQCCSLCQP	16140	13470	44975	13964	13909
7. INSQCCSLCQPGQ	15918	13390	54811	13652	13751
8. SQCCSLCQPGQKL	18804	13271	60441	13872	13819
9. CCSLCQPGQKLVS	16534	13436	56601	13821	13851
10. SLCQPGQKLVSDC	18155	13314	54718	13705	13965
11. CQPGQKLVSDCTE	17614	13460	52073	13699	13781
12. PGQKLVSDCTEFT	91270	13334	58177	13464	13725
13. QKLVSDCTEFTET	96926	13465	49003	14916	13875
14. LVSDCTEFTETEC	141877	13634	62580	13394	13783
15. SDCTEFTETECCLP	148692	13213	42916	13571	13696
16. CTEFTETECCLPCG	145926	13591	38170	13220	13824
17. EFTETECCLPCGES	136350	13593	56597	13434	13638
18. TETECCLPCGESEF	77805	13298	33201	13398	13723
19. TECLPCGESEFLD	50648	13544	29781	13488	13685
20. CLPCGESEFLDTW	79246	13736	26075	13599	13807
21. PCGESEFLDTWNR	93482	13626	44337	16142	13830
22. GESEFLDTWNRET	68932	14815	45811	13777	13832
23. SEFLDTWNRETHC	105899	13777	40462	14023	13898
24. FLDTWNRETHCHQ	55803	15498	79990	40210	13937
25. DTWNRETHCHQHCK	19237	13367	34525	13995	13737
26. WNRETHCHQHCKYC	22963	13843	32912	15601	13595
27. RETHCHQHCKYCDP	16522	13282	41600	13644	13595
28. THCHQHCKYCDPNL	25181	13211	32264	13567	13621
29. CHQHCKYCDPNLGL	16455	13300	34480	13684	13671
30. QHCKYCDPNLGLRV	16627	13541	39057	13461	13670
31. KYCDPNLGLRVQQ	16429	13491	46485	13452	13779
32. CDPNLGLRVQQKG	16877	13454	90926	13293	13799
33. PNLGLRVQQKGTS	18117	13611	123330	13358	13917
34. LGLRVQQKGTSSET	22898	13512	237353	13381	15032
35. LRVQQKGTSSETDT	24787	13599	250401	13364	13774
36. VQQKGTSSETDTIC	28492	13372	35303	13124	13686
37. QKGTSSETDTICTC	27724	13490	35334	13298	13569
38. GTSETDTICTCEE	18834	13340	29905	13289	13525
39. SETDTICTCEEGW	16914	13340	24871	13315	13486
40. TDTICTCEEGWHC	17866	13568	24475	13481	13631

【図 1 A-2】

配列	2105	KM643-4-11	F2-103	110	KM341-1-19
41. TICTCEEGWHCTS	18122	13767	24169	13564	68670
42. CTCEEGWHCTSEA	17485	18955	28190	13736	75214
43. CEEGWHCTSEACE	16859	41843	32056	13525	16033
44. EGWHCTSEACESC	17735	13381	35518	13771	13867
45. WHCTSEACESCVL	64890	13444	38190	13708	13687
46. CTSEACESCVLHR	16788	13446	39497	13859	13636
47. SEACESCVLHRSC	16421	13555	40206	13482	13584
48. ACESCVLHRSCSP	15795	13183	36735	13503	13575
49. ESCVLHRSCSPGF	47038	13504	41251	14500	13637
50. CVLHRSCSPGFGV	17469	13279	45795	13484	13573
51. LHRSCSPGFGVKQ	16635	13382	88644	13187	13567
52. RSCSPGFGVKQIA	16642	13339	114128	13368	13623
53. CSPGFGVKQIATG	17457	13485	110624	13323	13703
54. PGFGVKQIATGVS	18818	13577	253876	13234	13769
55. FGVKQIATGVSDT	20521	13429	697242	13178	13903
56. VKQIATGVSDTIC	20855	13510	91544	13176	13681
57. QIATGVSDTICEP	19014	13523	40193	13154	13575
58. ATGVSDTICEPCP	17139	13526	38012	13127	13599
59. GVSdTICEPCPVG	16515	13508	31118	13376	13571
60. SDTICEPCPVGFF	42762	13590	25542	13392	13534
61. TICEPCPVGFFSN	25039	13366	27921	13524	13783
62. CEPCPVGFFSNVS	18141	13429	31377	14364	13717
63. PCPVGFFSNVSSA	20806	13343	51411	19243	13979
64. PVGFFSNVSSAFE	95541	14553	128669	158203	14523
65. GFFSNVSSAFEKC	67908	13506	94016	14323	13831
66. FSNVSSAFEKCHP	22379	13350	124184	14057	13699
67. NVSSAFEKCHPWT	18703	13298	44966	13518	13676
68. SSAFEKCHPWTSC	19809	13459	37784	13433	13553
69. AFEKCHPWTSCET	16212	13387	38013	13279	13683
70. EKCHPWTSCETKD	15198	13423	39248	13315	13494
71. CHPWTSCETKDLV	15754	13383	40627	13228	13673
72. PWTSCETKDLVVQ	15609	13426	46662	13247	13613
73. TSCETKDLVVQQA	16454	13377	46750	13228	13670
74. CETKDLVVQQAGT	16875	13544	42504	13185	13700
75. TKDLVVQQAGTNK	17357	14026	83860	13184	13674
76. DLVVQQAGTNKTD	17735	13434	34853	13151	13776
77. VVQQAGTNKTDVV	17176	13805	51573	13166	13651
78. QQAGTNKTDVVCV	15794	13261	27337	13103	13398
79. AGTNKTDVVCVGP	15793	13448	25989	13304	13658
80. TNKTDVVCVGPQDR	15114	13481	24807	13109	13767
81. KTDVVCVGPQDRLR	15782	13328	35951	13548	14112
82. DVVCVGPQDRLRAL	16644	13255	33393	13756	14104

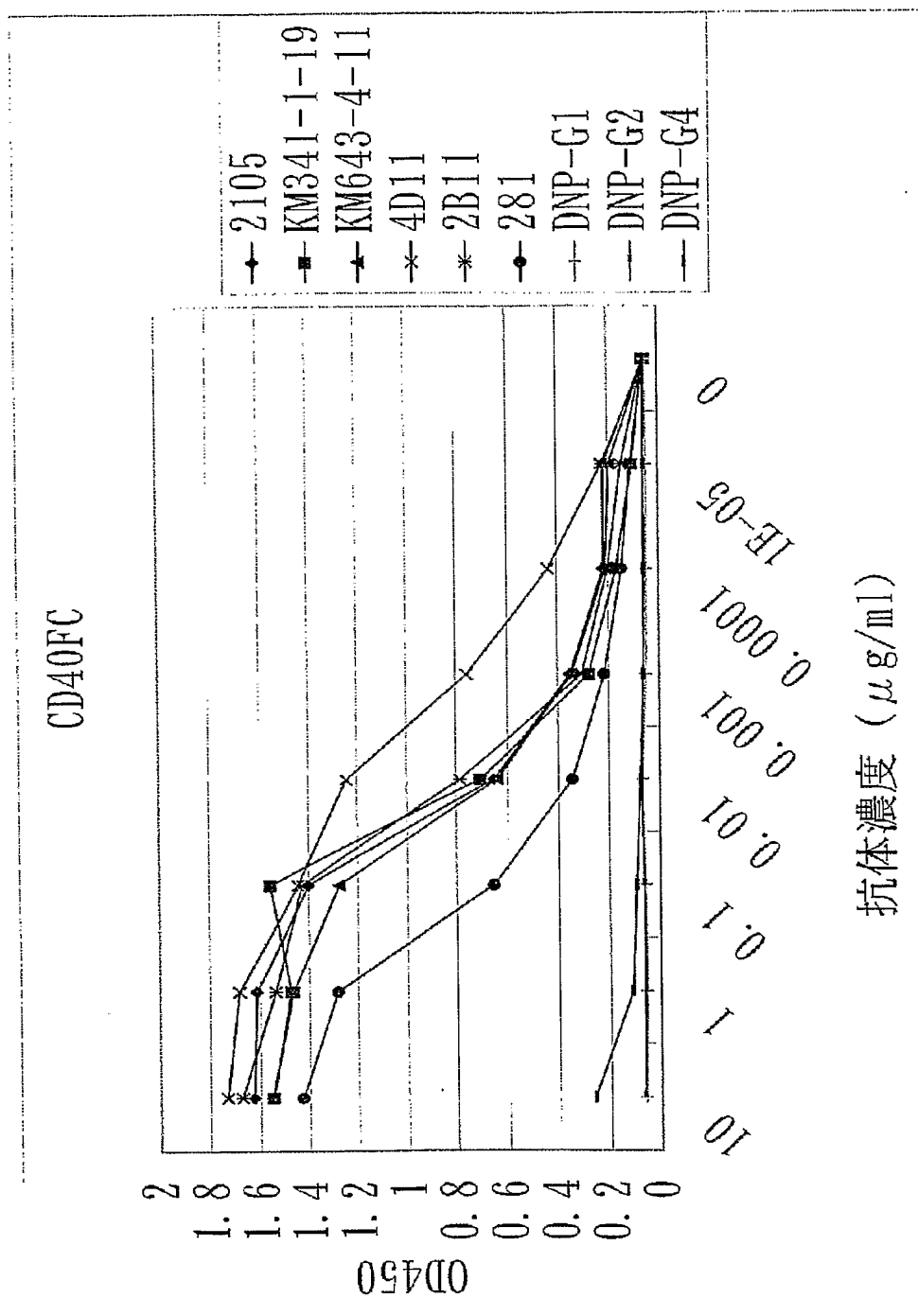
【図 1 B - 1】

配列	F4-465	281-1-10	2B11	F72	F76	4D11
1. EPPTACREKQYLI	20561	4194	14158	3965	3348	14138
2. PTACREKQYILINS	19249	4141	14276	3906	3420	14387
3. ACREKQYILINSQC	20418	4221	14276	3884	3300	14044
4. REKQYILINSQCCS	20278	4080	14214	3849	3546	13956
5. KQYILINSQCCSLC	19642	4169	14082	3806	3378	14443
6. YILINSQCCSLCQP	19658	4184	14231	4082	3464	14432
7. INSQCCSLCQPGQ	18482	4603	13927	3986	3157	13783
8. SQCCSLCQPGQKL	19075	4326	13748	3934	3675	13471
9. CCSLCQPGQKLV	20282	4349	13578	4046	3335	13431
10. SLCQPGQKLVSDC	20175	4841	13522	3948	3222	13387
11. CQPGQKLVSDCTE	22520	4576	13441	4115	3565	13339
12. PGQKLVSDCTEFT	23688	4499	13618	4012	3525	13290
13. QKLVSDCTEFTET	22029	4771	13528	4294	3539	13450
14. LVSDCTEFTETEC	23692	5212	13439	4177	3601	14898
15. SDCTEFTETECILP	25950	4864	13359	4095	3362	13277
16. CTETETECILPCG	20943	4906	13496	4121	3582	13874
17. RFTETECILPCGES	37123	4748	13570	3960	3402	16583
18. TETECILPCGESEF	23400	4807	13444	3811	3407	13808
19. TECLPCGESEFLD	21427	4849	13352	3970	3288	13566
20. CLPCGESEFLDTW	18021	4794	19449	3940	5926	47209
21. PCGESEFLDTWNR	26480	7656	86887	5478	16438	165895
22. GESEFLDTWNR	25229	4906	24124	4337	4362	32083
23. SEFLDTWNRETHC	23274	5979	30344	4138	4083	72724
24. FLDTWNRETHCHQ	28280	19544	120439	4636	6401	336496
25. DTWNRETHCHQH	20114	4107	14285	4029	3459	14028
26. WNRETHCHQHKEYC	21110	4714	16070	4111	3819	25715
27. RETHCHQHKEYCDP	19452	4075	13942	4000	3252	13812
28. THCHQHKEYCDPNL	18412	4221	14203	3912	3459	14295
29. CHQHKEYCDPNLGL	18890	4288	16566	4025	3473	13886
30. QHKEYCDPNLGLRV	19296	4313	13580	4132	3383	13355
31. KYCDPNLGLRVQQ	20430	4460	13469	4254	3651	13357
32. CDPNLGLRVQQKG	28700	4570	13568	5394	4575	13336
33. PNLGLRVQQKGT	39822	5229	13590	24278	6996	13404
34. LGLRVQQKGTSET	52908	4681	13651	7042	4112	13400
35. LRVQQKGTSETDT	56985	4376	13514	4839	16679	13557
36. VQQKGTSETDTIC	21684	4531	13423	3960	3258	13355
37. QKGTSETDTICTC	21838	4509	13507	3975	3355	13365
38. GTSETDTICTCEE	21896	4074	13348	3856	3298	13453
39. SETDTICTCEEGW	18789	4082	13377	3687	3297	13606
40. TDTICTCEEGWHC	17729	4187	13485	3756	3638	19679

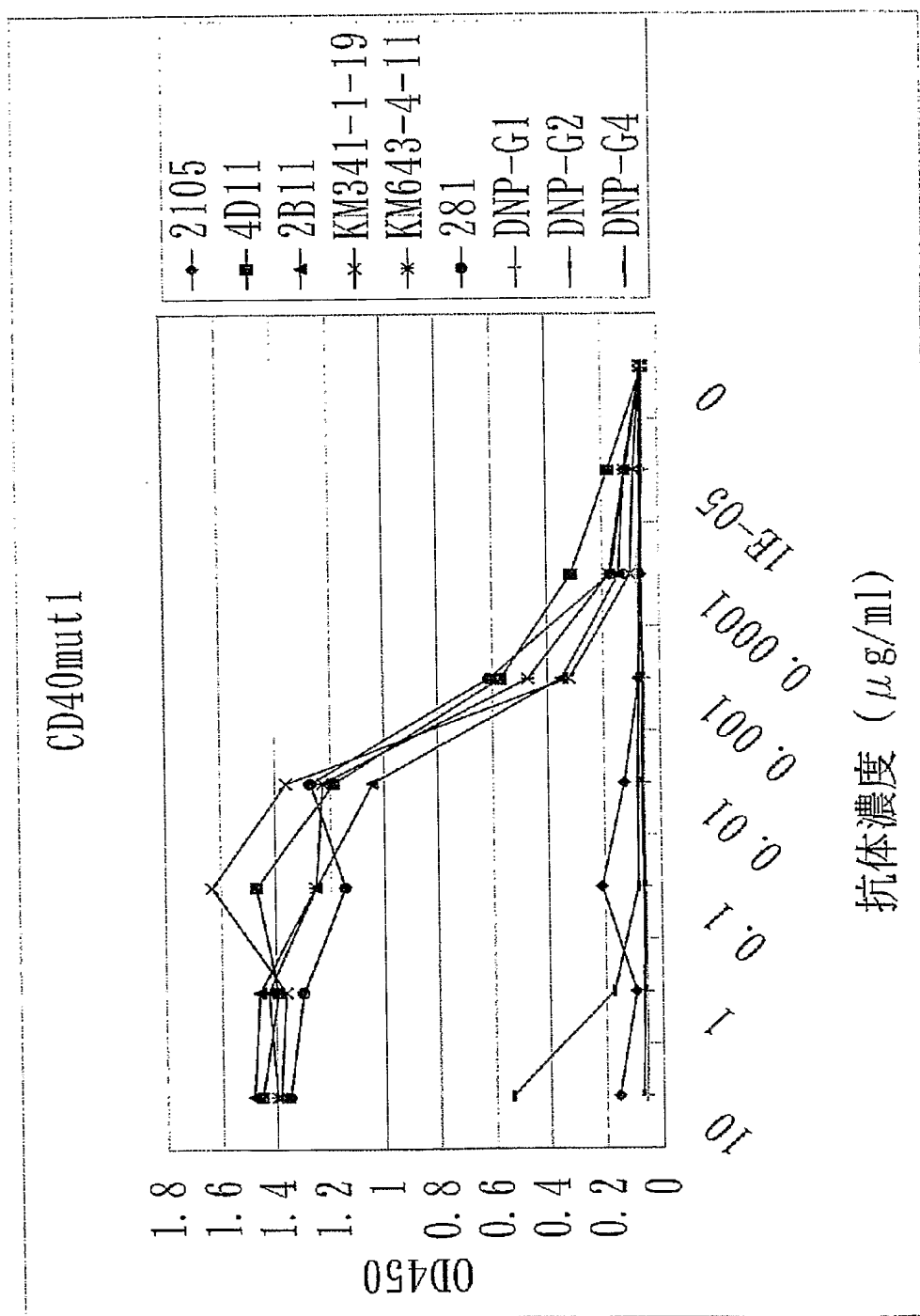
【図 1 B-2】

配列	F4-465	281-1-10	2B11	F72	F76	4D11
41. TICTCEEGWHCTS	22932	4207	14559	4151	3992	46128
42. CTCBEGWHCTSEA	22823	4167	14428	4077	3394	14309
43. CEEGWHCTSEACE	25545	4071	14192	4118	3375	14162
44. EGWHCTSEACESC	23461	4272	14290	4171	3393	14029
45. WHCTSEACESCVL	20999	4198	14136	4318	3465	14065
46. CTSEACESCVLHR	20553	4273	14301	4152	3396	14337
47. SEACESCVLHRSC	20792	4234	13900	4122	3439	13877
48. ACESCVLHRSCSP	21816	4179	13741	3934	3525	13539
49. ESCVLHRSCSPGF	20599	4725	13758	4141	3514	13658
50. CVLHRSCSPGFGV	19851	4393	13533	4127	3526	13320
51. LHRSCSPGFGVKQ	23160	4317	13486	4851	18376	13355
52. RSCSPGFGVKQIA	24797	4495	13728	5568	15584	13375
53. CSPGFGVKQIATG	30890	4962	13400	8711	3383	13340
54. PGFGVKQIATGVS	82448	5027	13415	11404	4102	13378
55. FGVKQIATGVSDT	126309	4541	13423	4896	3515	13474
56. VKQIATGVSDTIC	32389	4361	13454	4040	3278	13305
57. QIATGVSDTICEP	28554	4308	13325	3807	3318	13350
58. ATGVSDTICEPCP	22484	4176	13463	3868	3241	13399
59. GVSDTICEPCPVG	21417	4277	13329	3584	3259	13475
60. SDTICEPCPVGFF	20192	4360	13337	3725	3358	14425
61. TICEPCPVGFFSN	25475	4390	14453	4101	3446	15502
62. CEPCPVGFFSNVS	26387	4419	14370	4434	3538	14441
63. PCPVGFFSNVSSA	40241	4468	14425	4363	3409	14664
64. PVGFFSNVSSAFE	27432	11225	85492	4772	5735	49493
65. GFFSNVSSAFEKC	77408	4483	14402	4173	3489	14521
66. FSNVSSAFEKCHP	57923	4088	14050	4230	3296	13989
67. NVSSAFEKCHPWT	23154	4031	13752	4025	3343	13619
68. SSAFEKCHPWTSC	20994	4170	13512	4006	3419	13466
69. AFEKCHPWTSCET	21390	4498	13629	4028	3413	13518
70. EKCHPWTSCETKD	19639	4186	13571	3911	3403	15038
71. CHPWTSCETKDLV	20967	4215	13608	4177	3489	13283
72. PWTSCETKDLVVQ	23271	4300	13420	4459	3316	13507
73. TSCETKDLVVQQA	26353	4690	13457	4411	3496	13462
74. CETKDLVVQQAGT	26955	4517	13389	4600	3403	13433
75. TKDLVVQQAGTNK	63164	6695	13475	60382	7609	13271
76. DLVVQQAGTNKTD	25820	4567	13537	4057	3585	13328
77. VVQQAGTNKTDVV	28425	4587	13372	4179	3418	13309
78. QQAGTNKTDVVC	18474	4111	13455	3709	3809	13332
79. AGTNKTDVVCQPQ	18988	4186	13517	3868	3231	13436
80. TNKTDVVCQPQDR	18178	4662	13423	3854	4897	13350
81. KTDVVCQPQDRLR	27431	4208	13879	4242	4238	13779
82. DVVCQPQDRLRAL	28872	4127	14128	4179	3459	13856

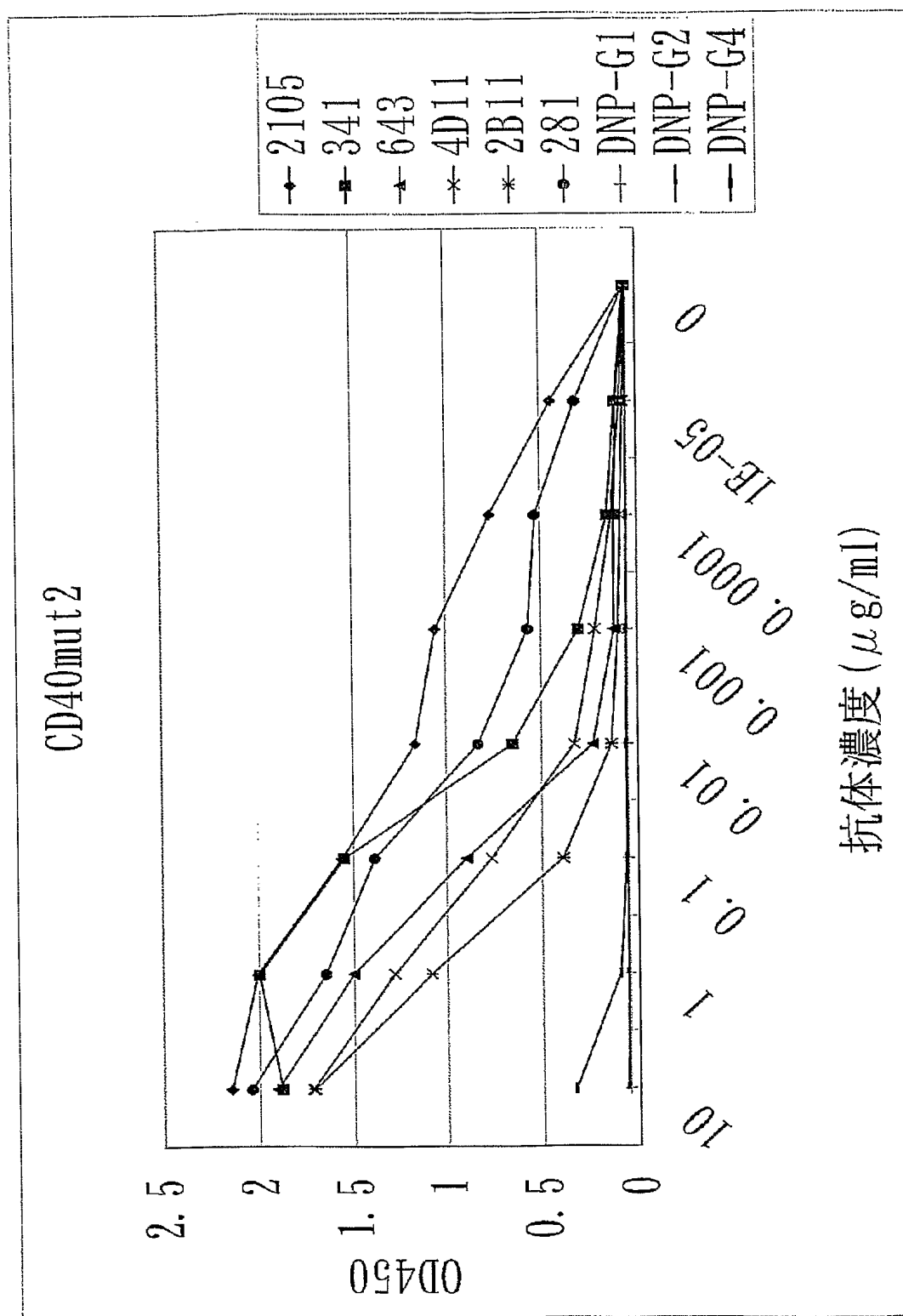
【図2A】



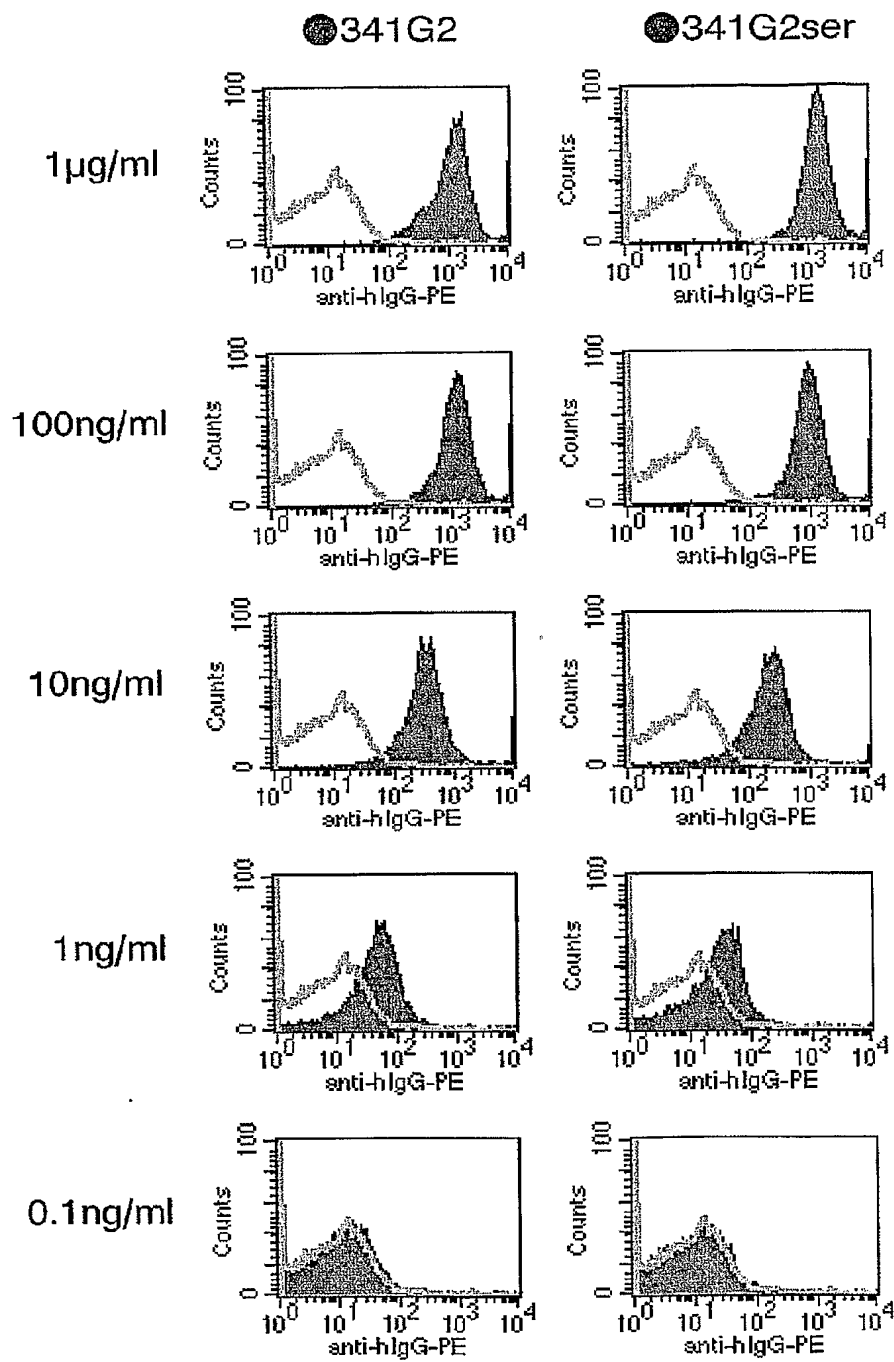
【図 2 B】



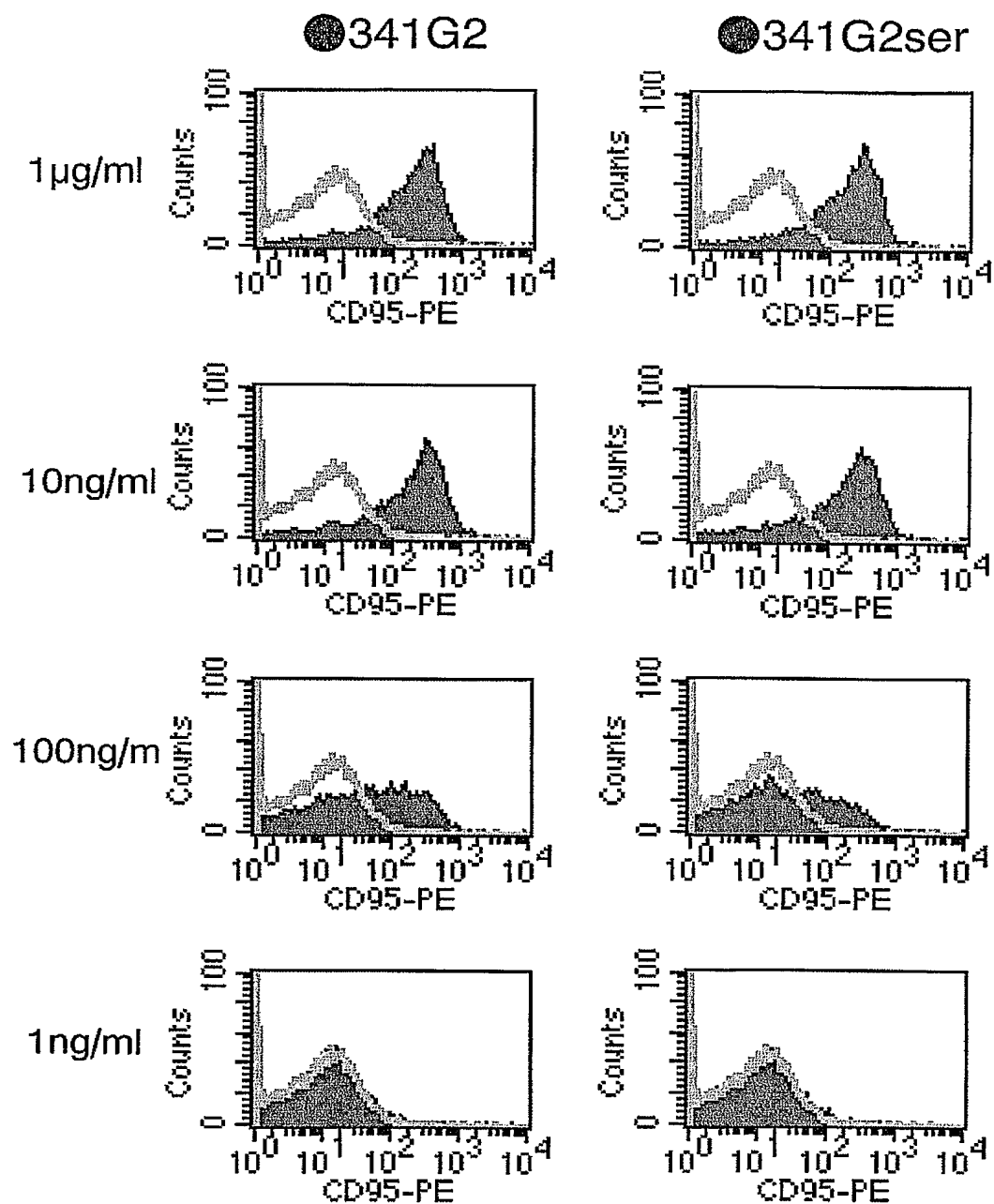
【図 2 C】



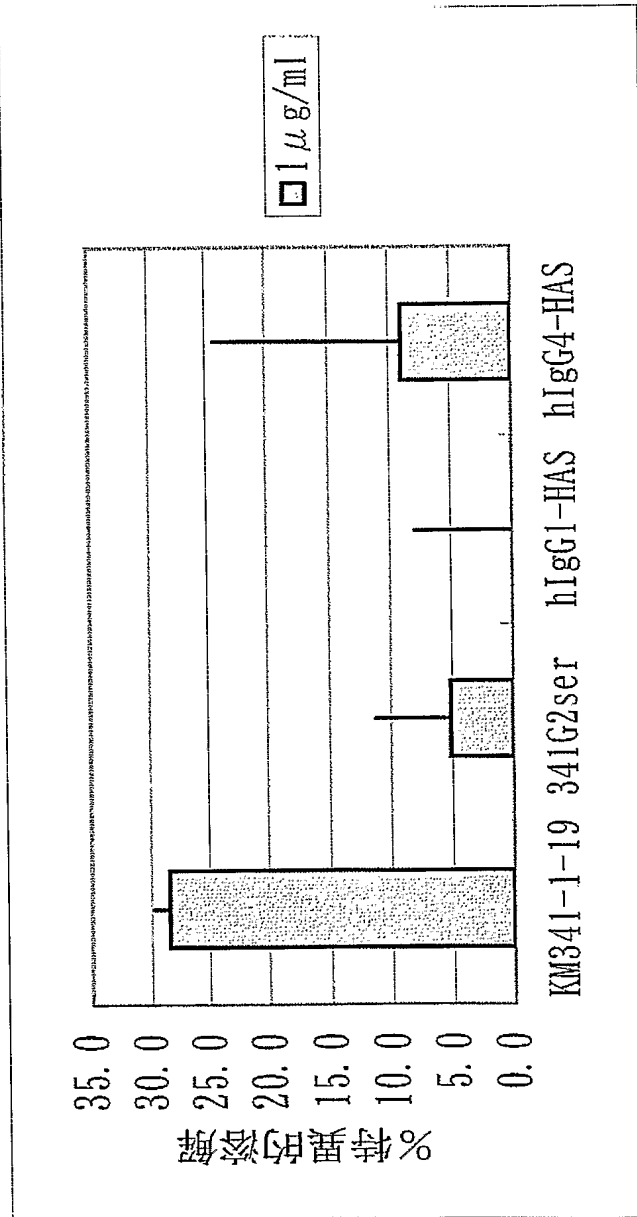
【図 3 A】



【図 3 B】

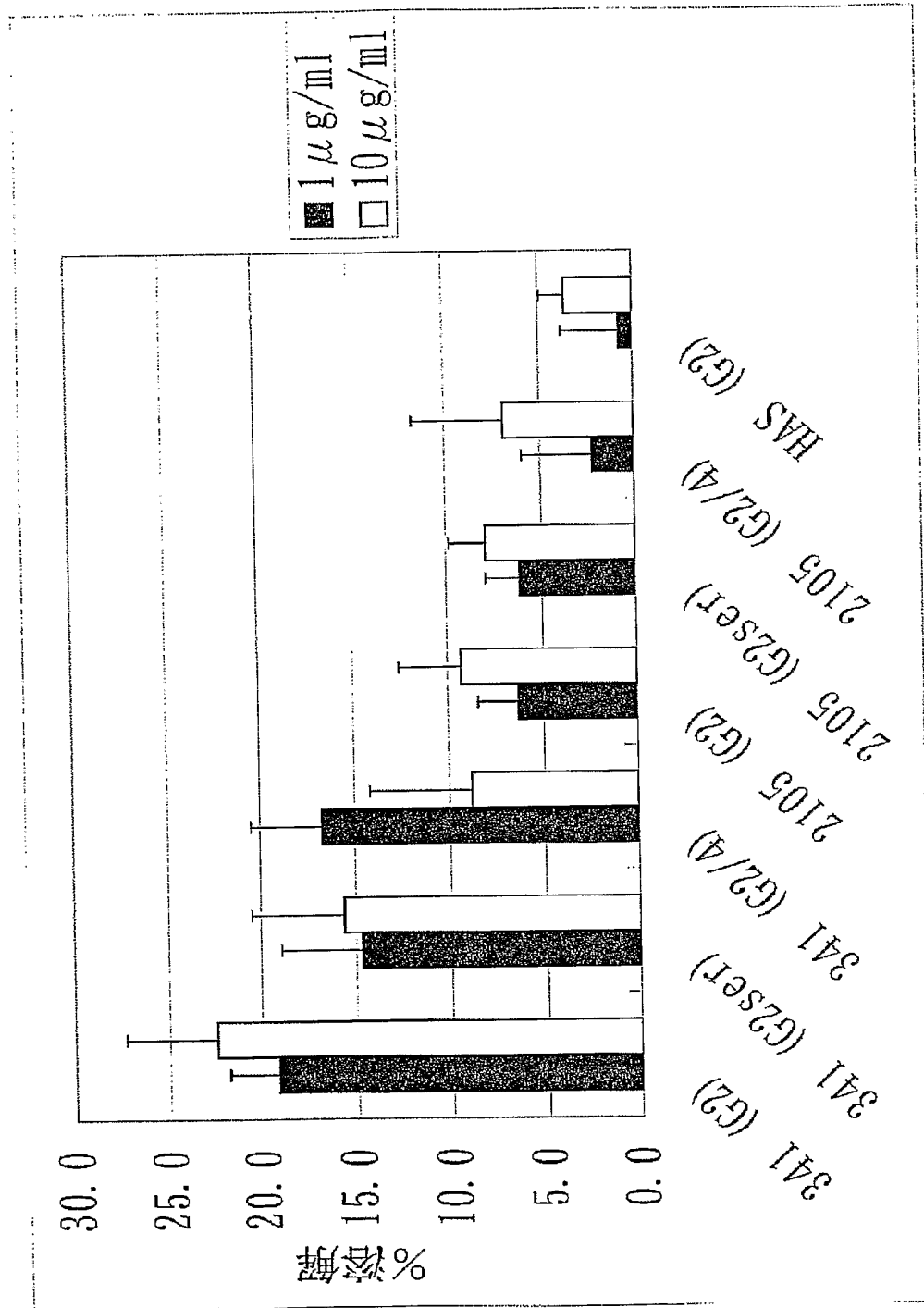


【図 4 A】

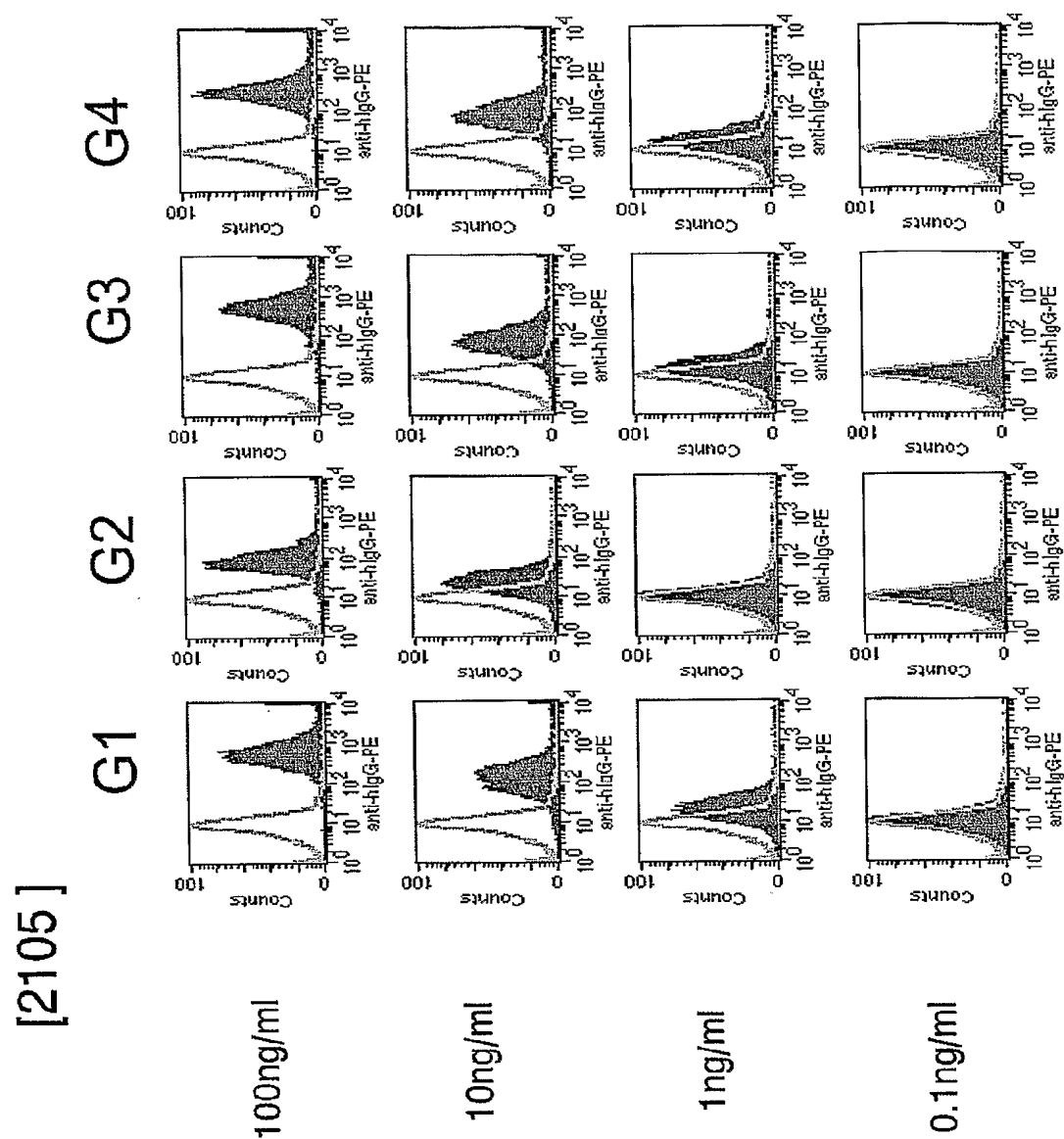


	1μg/ml	
KM341-1-19	28.4	1.3
341G2ser	5.1	6.1
hIgG1-HAS	0.0	8.0
hIgG4-HAS	9.0	15.3

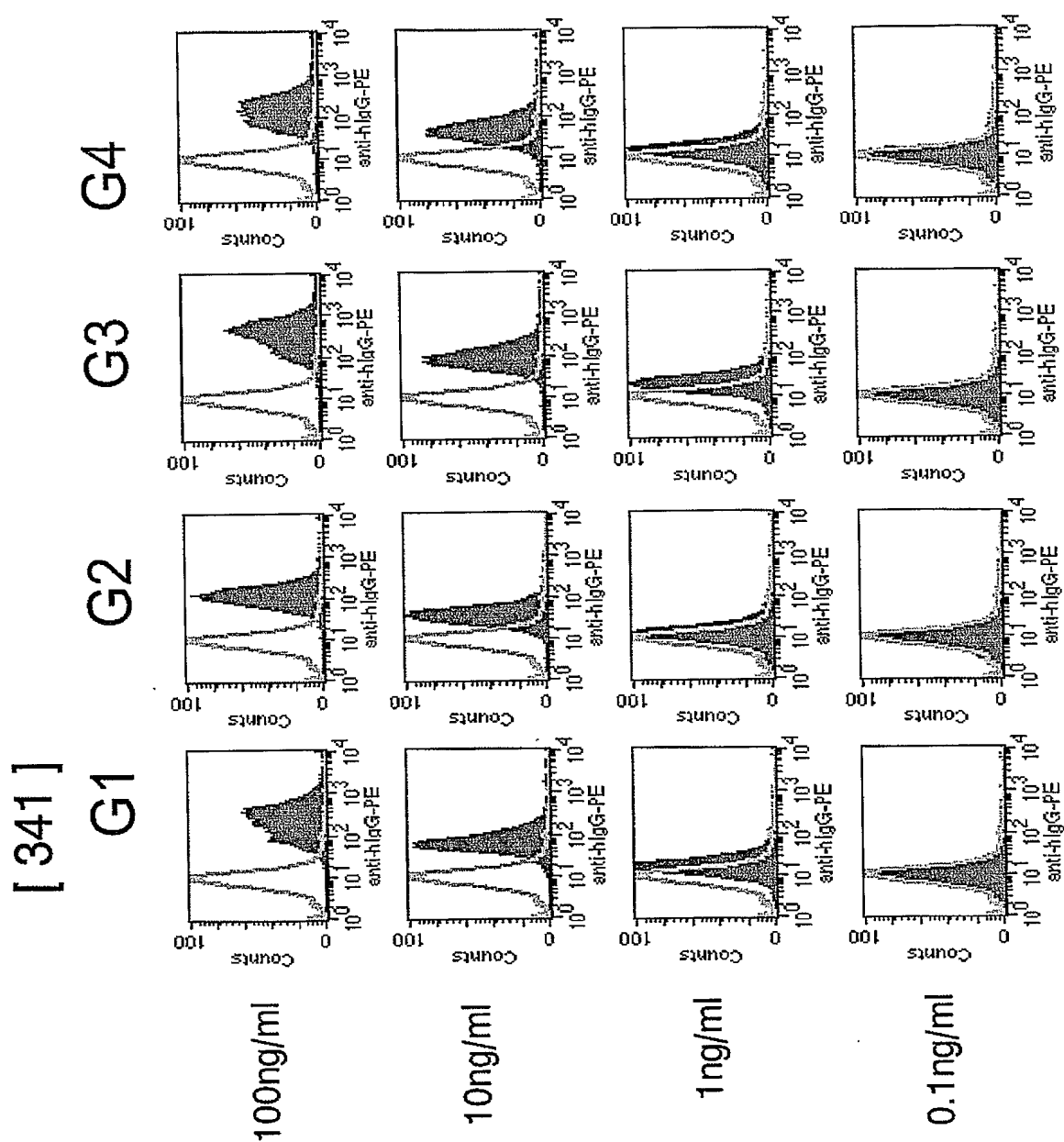
【図 4 B】



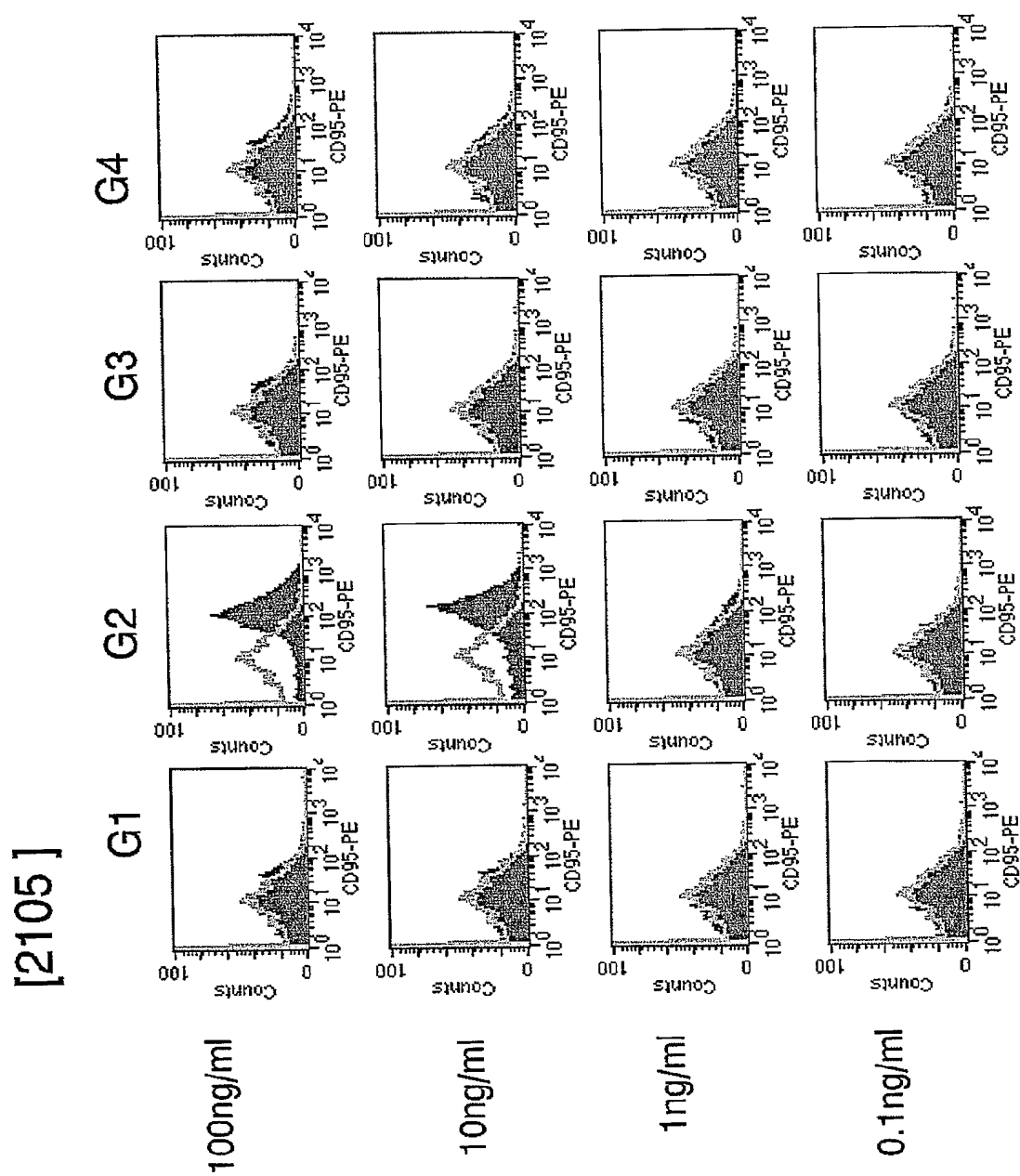
【図 5 A - 1】



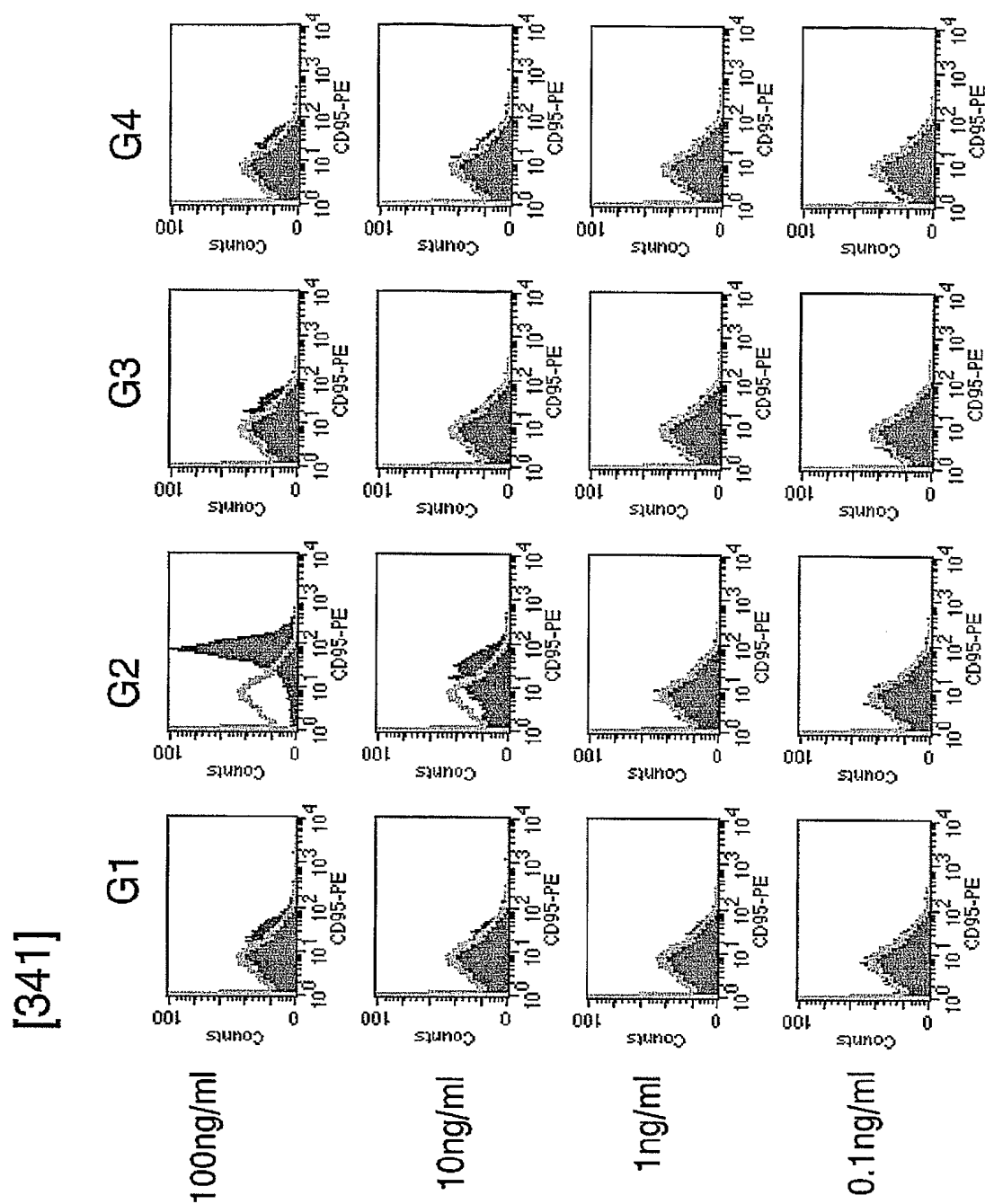
【図5A-2】



【図5B-1】

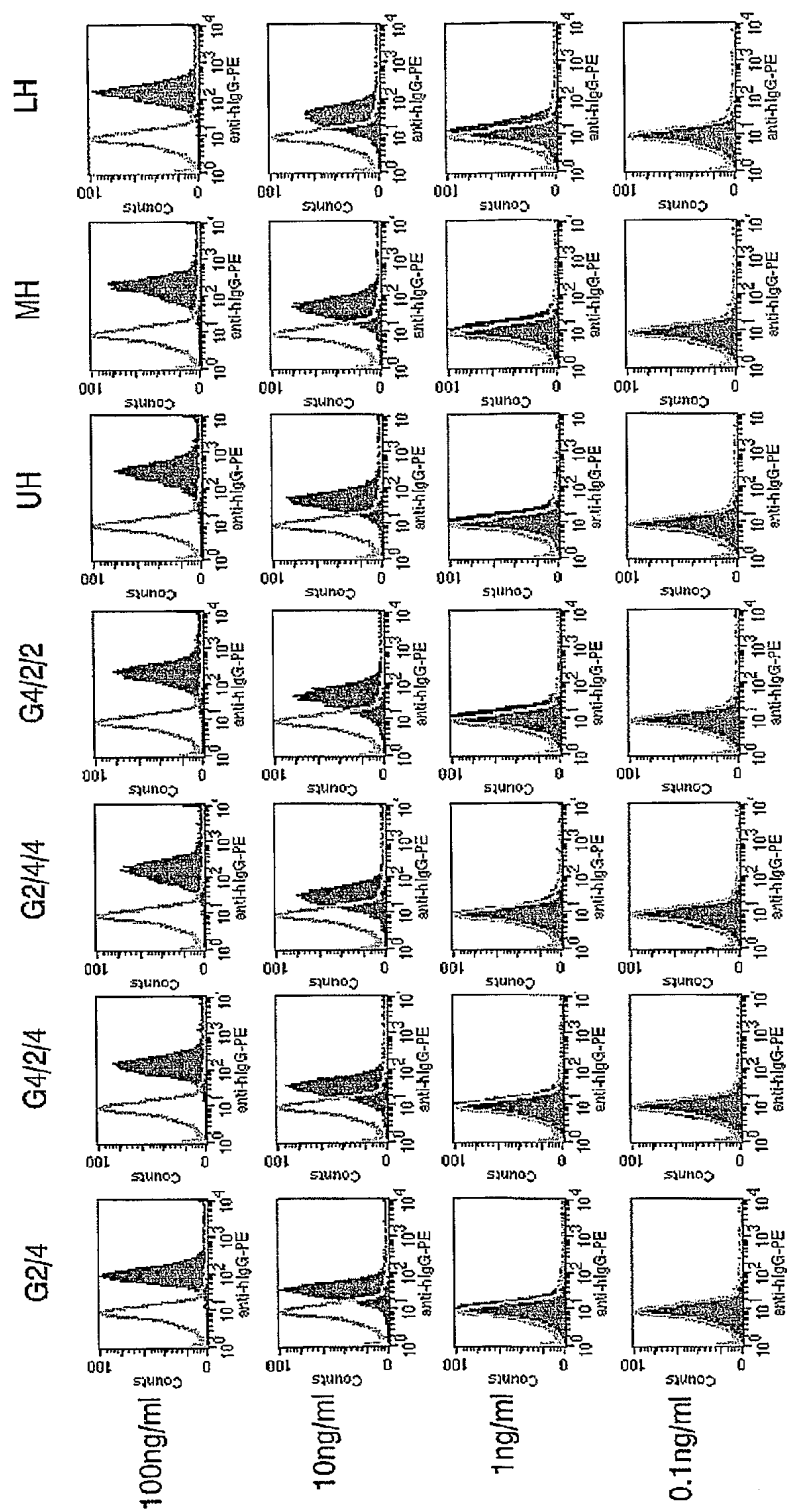


【図 5 B-2】



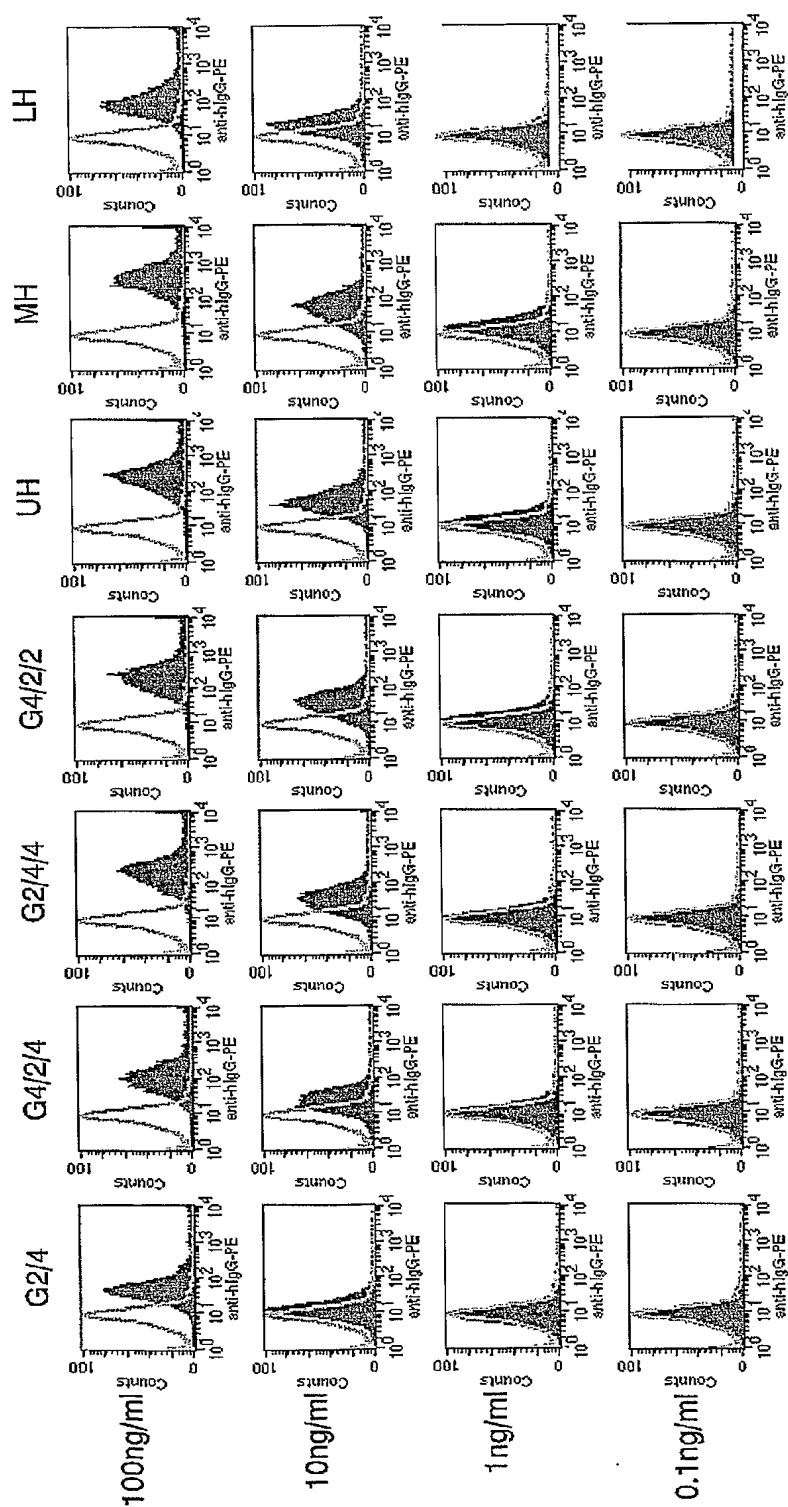
【図6A-1】

[341]

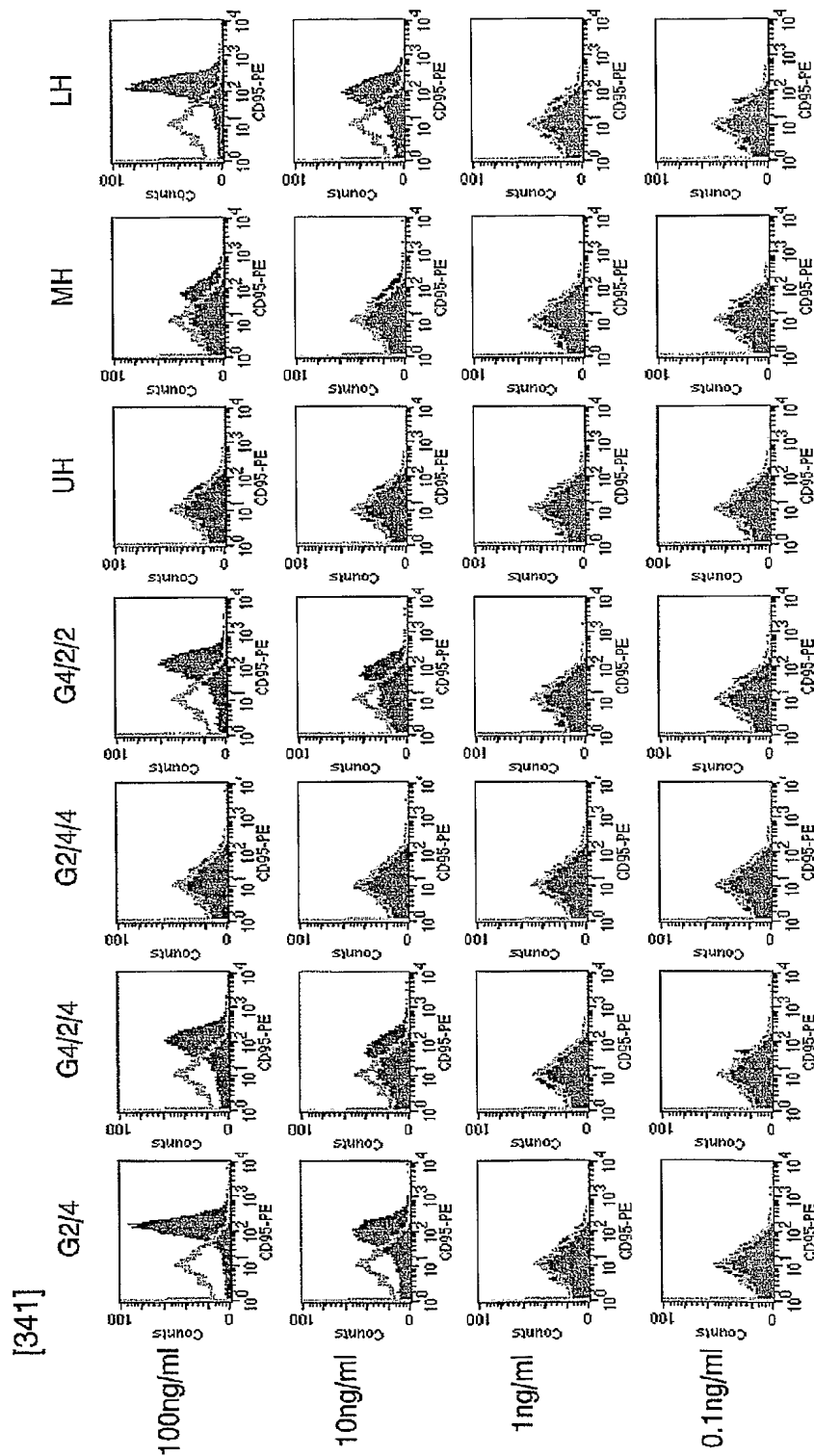


【図 6 A - 2】

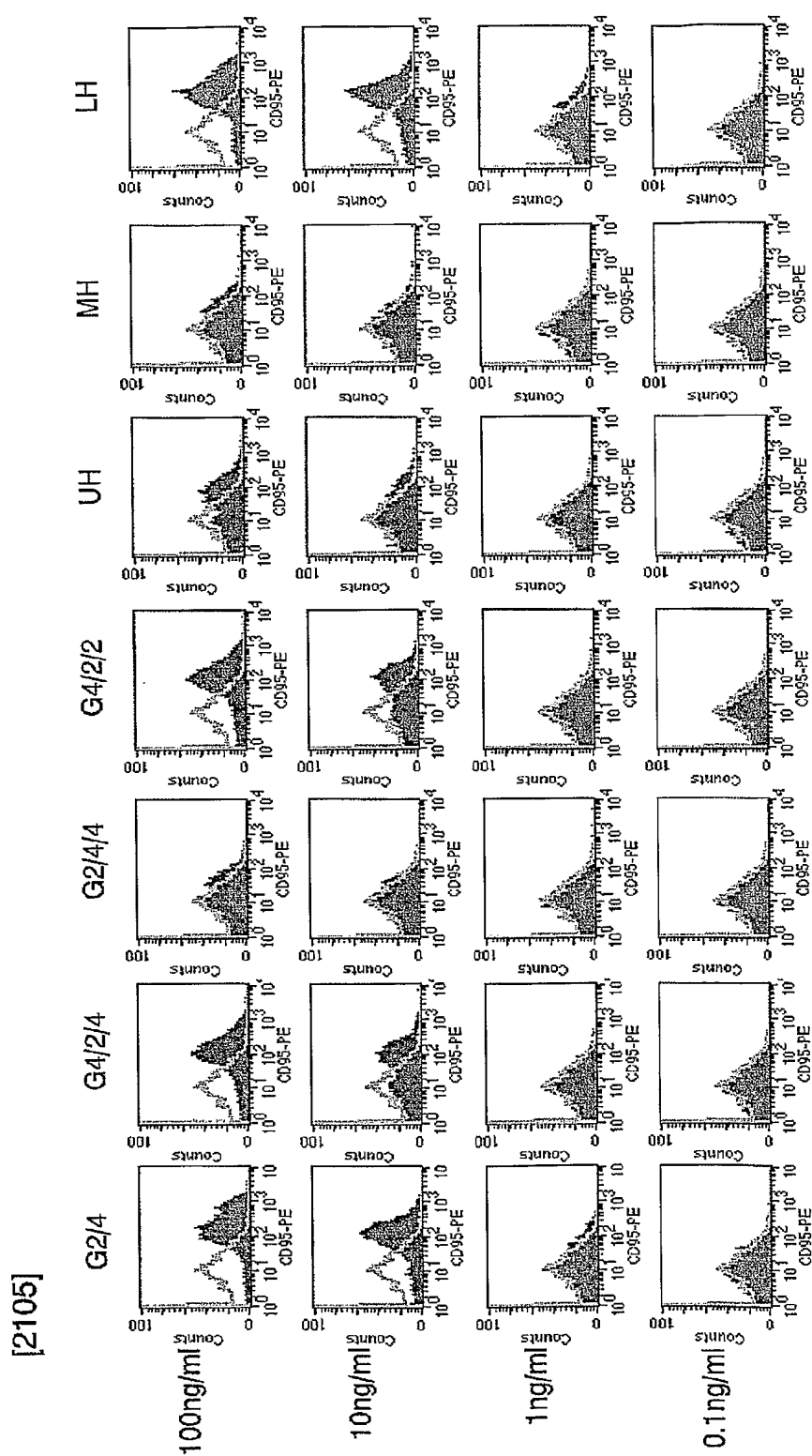
[2105]



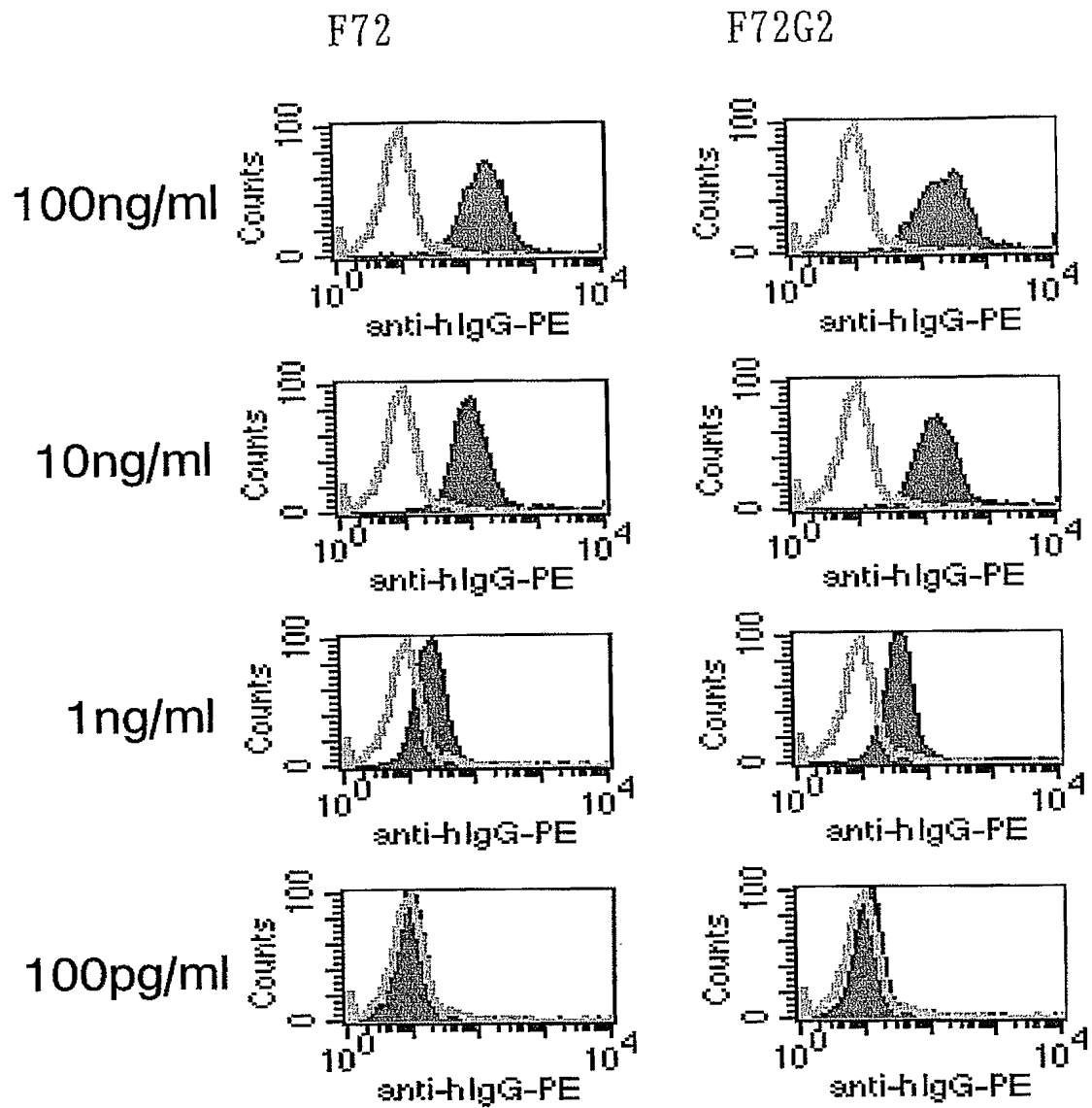
【図 6 B-1】



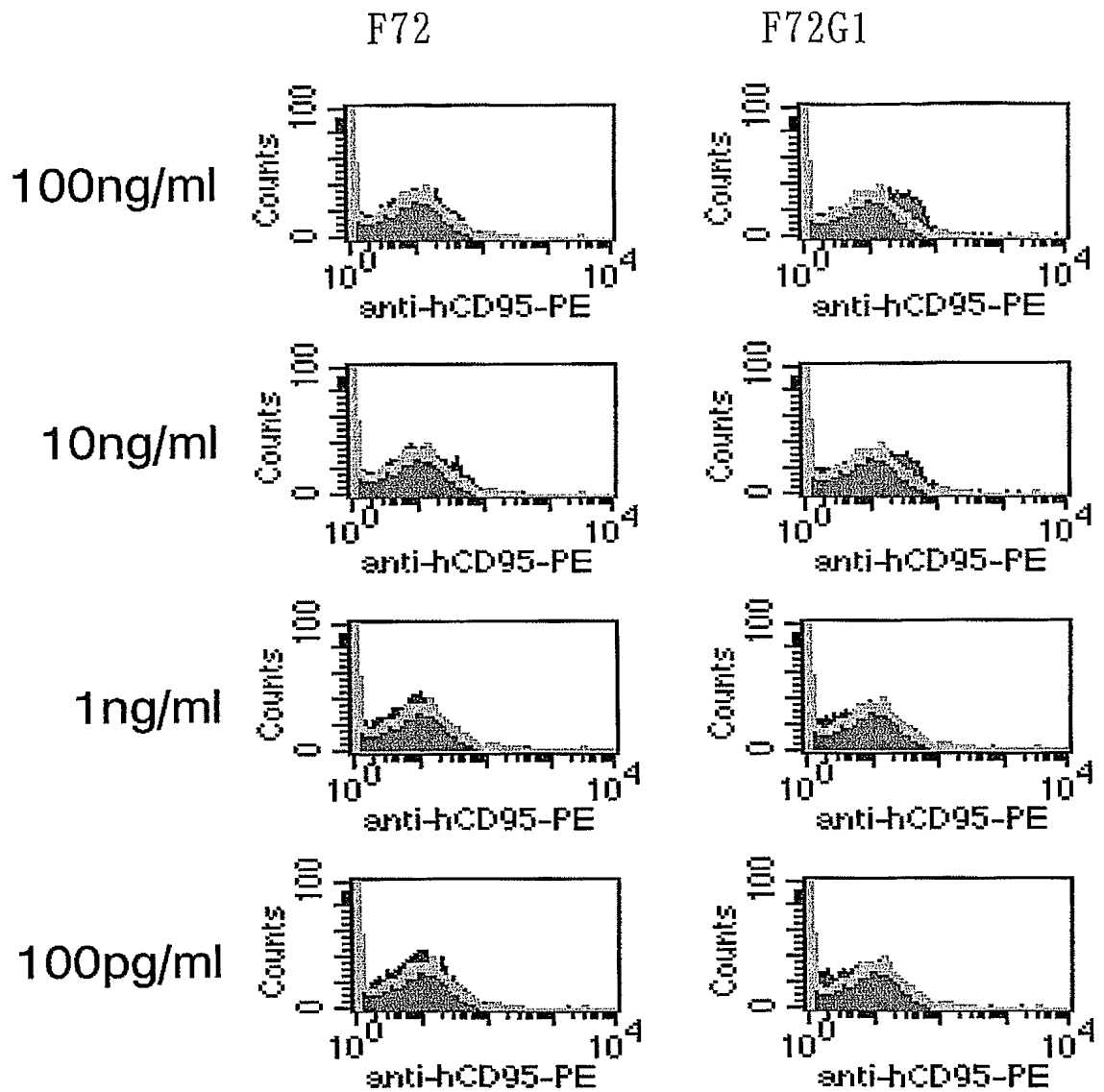
【図 6 B - 2】



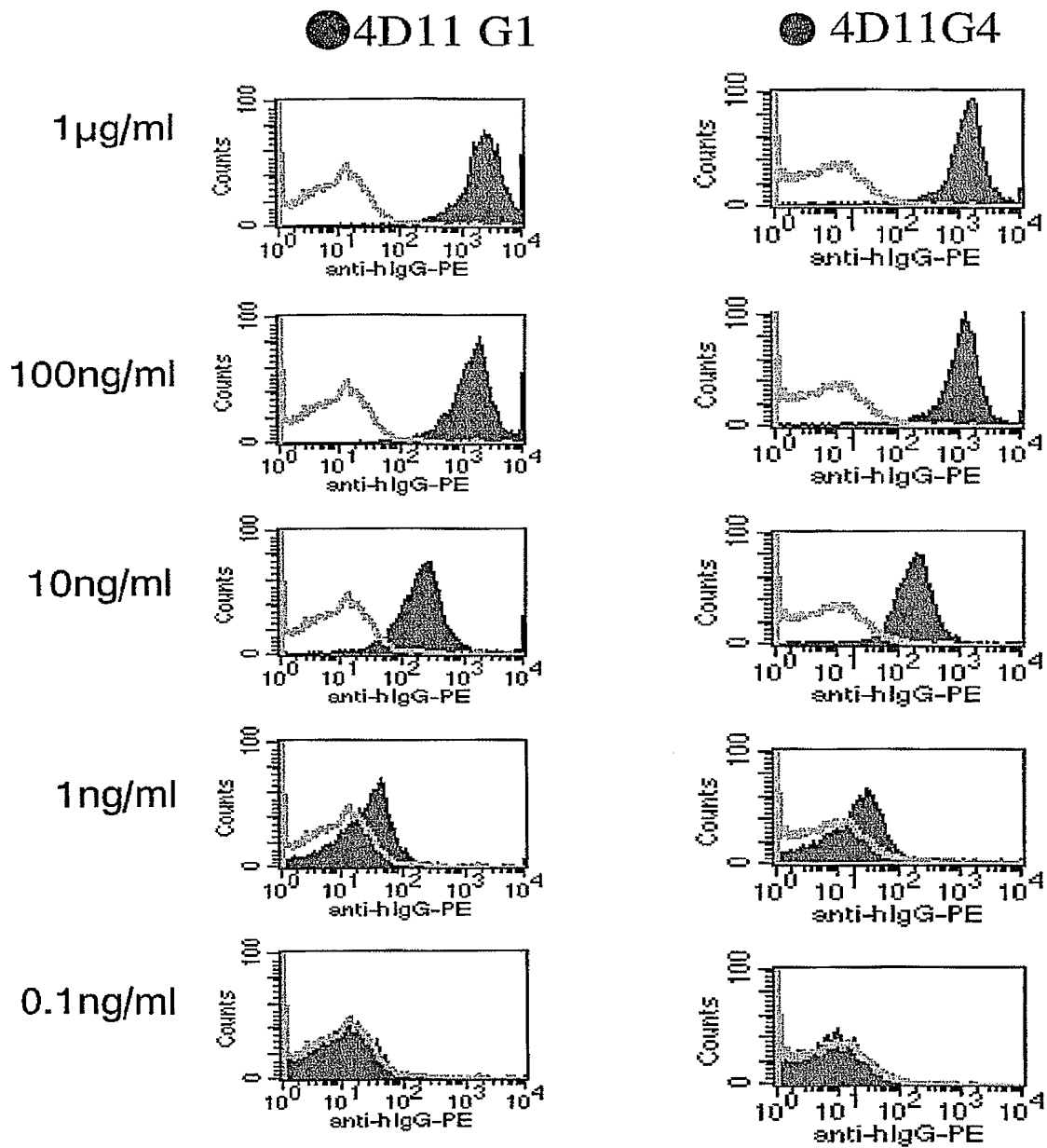
【図 7 A】



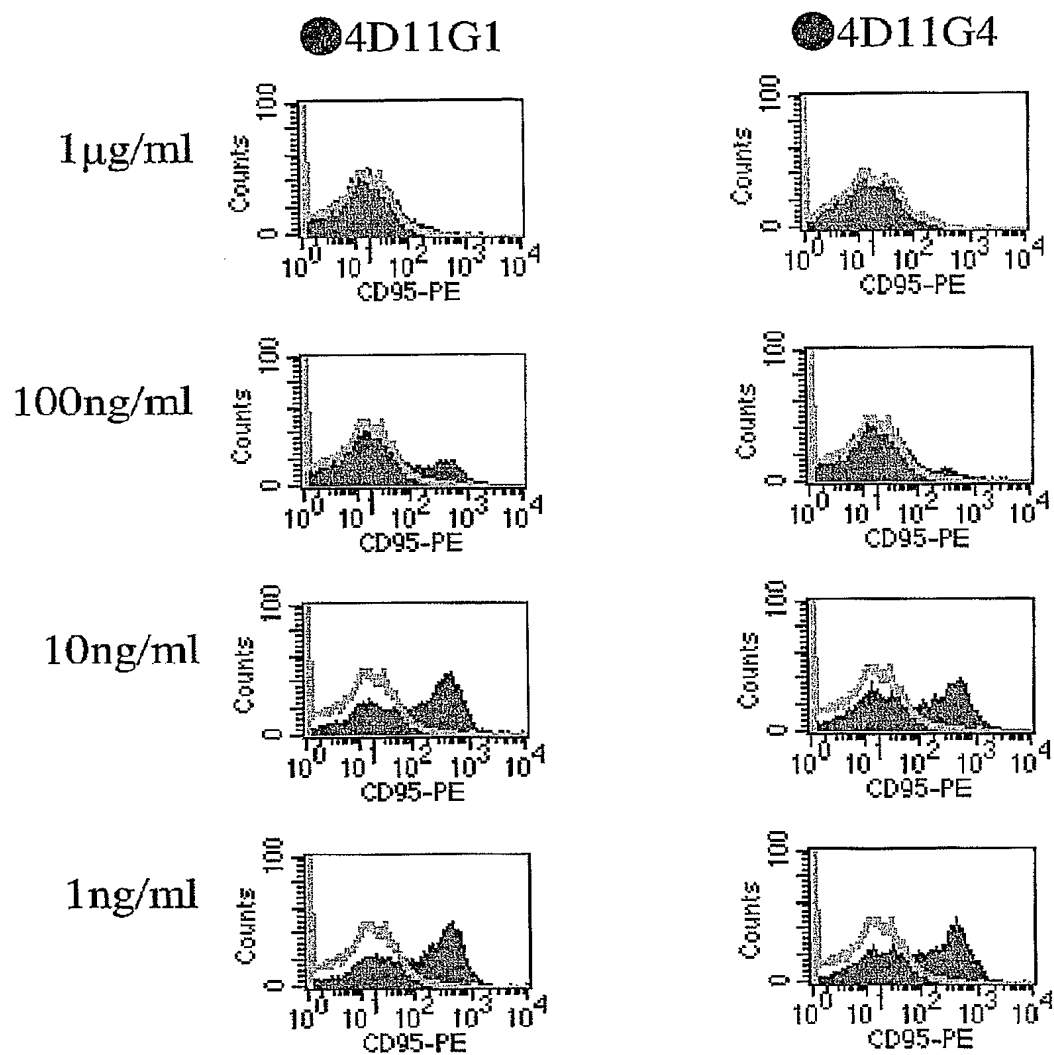
【図 7 B】



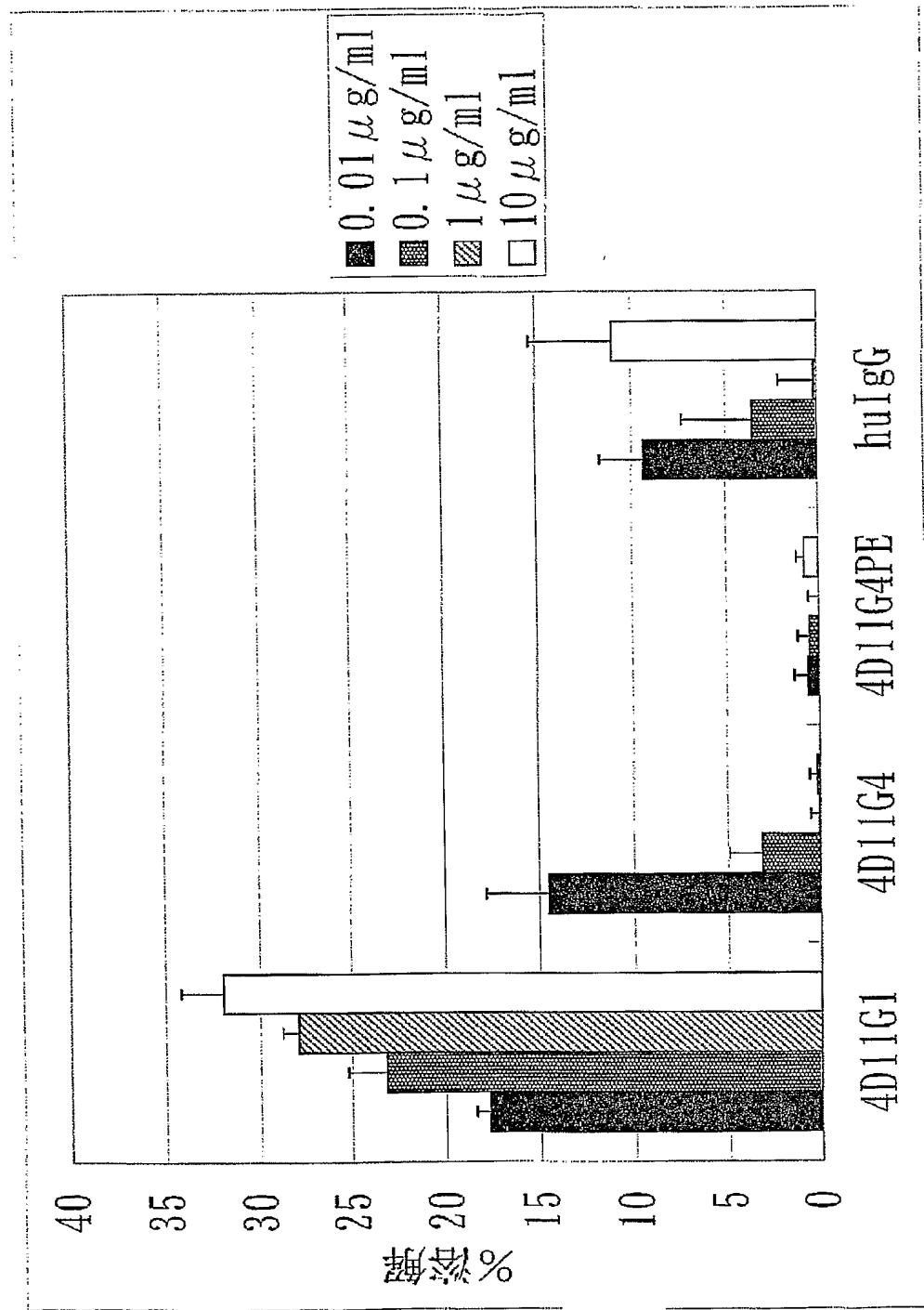
【図 8 A】



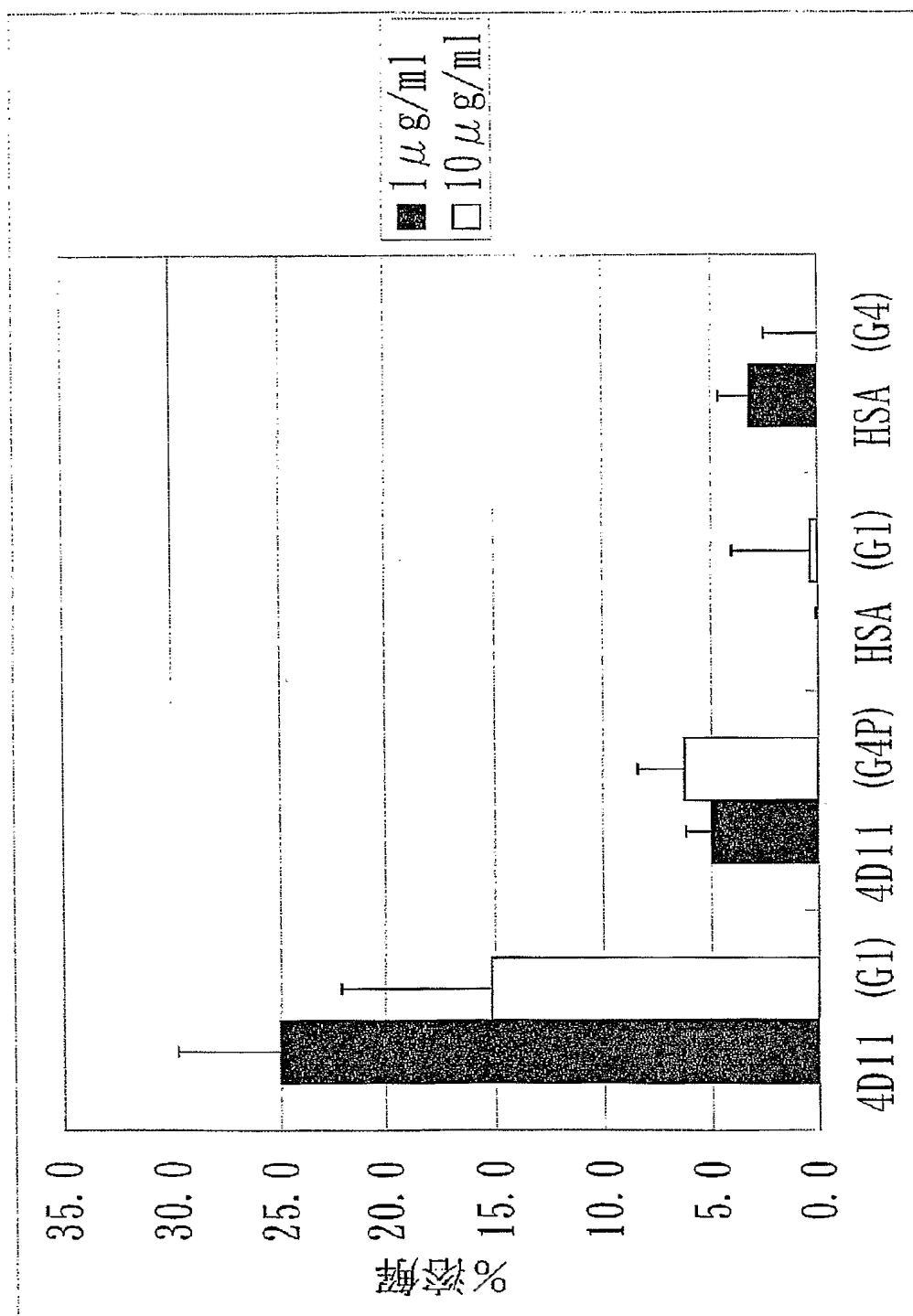
【図 8 B】



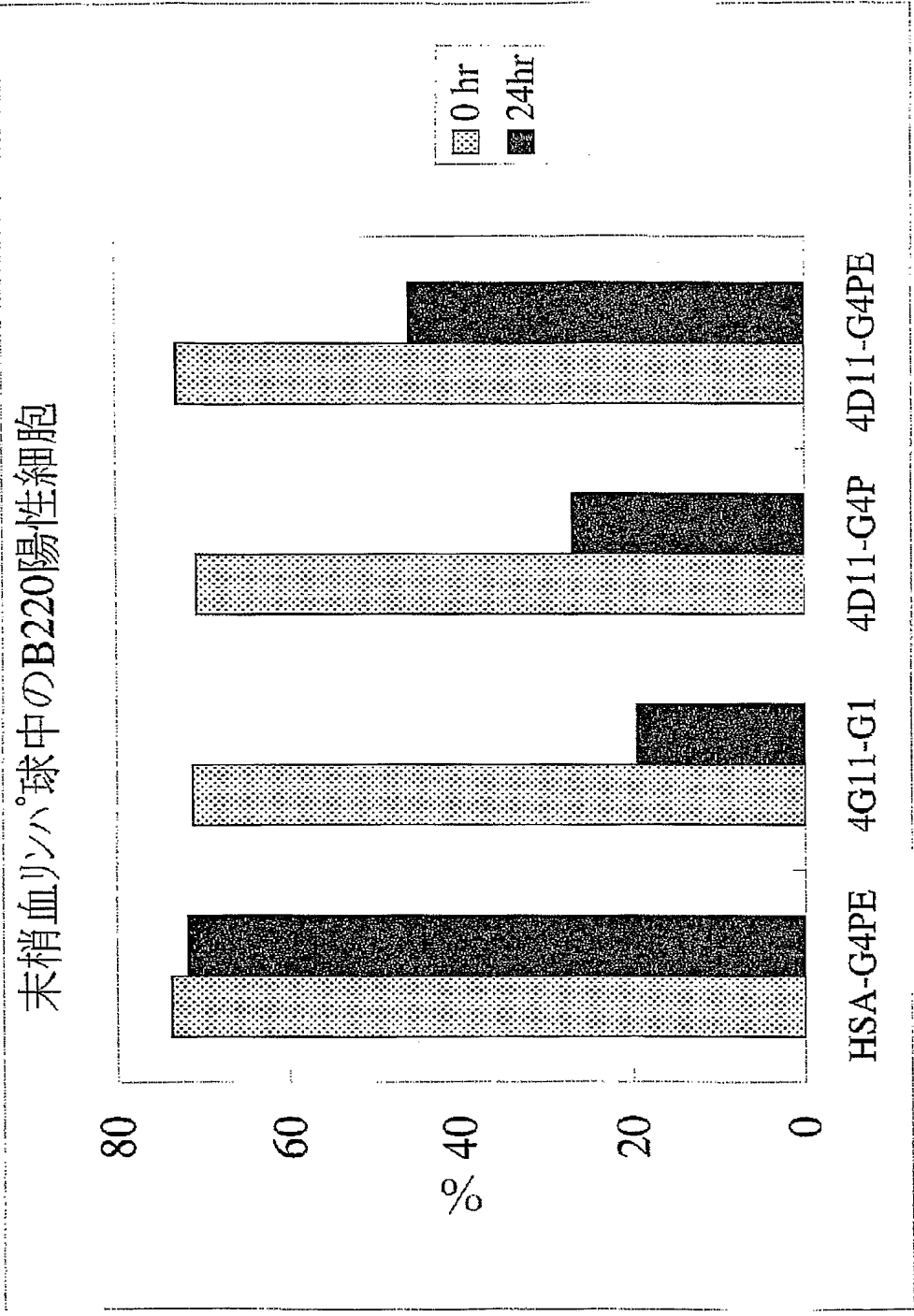
【図 9】



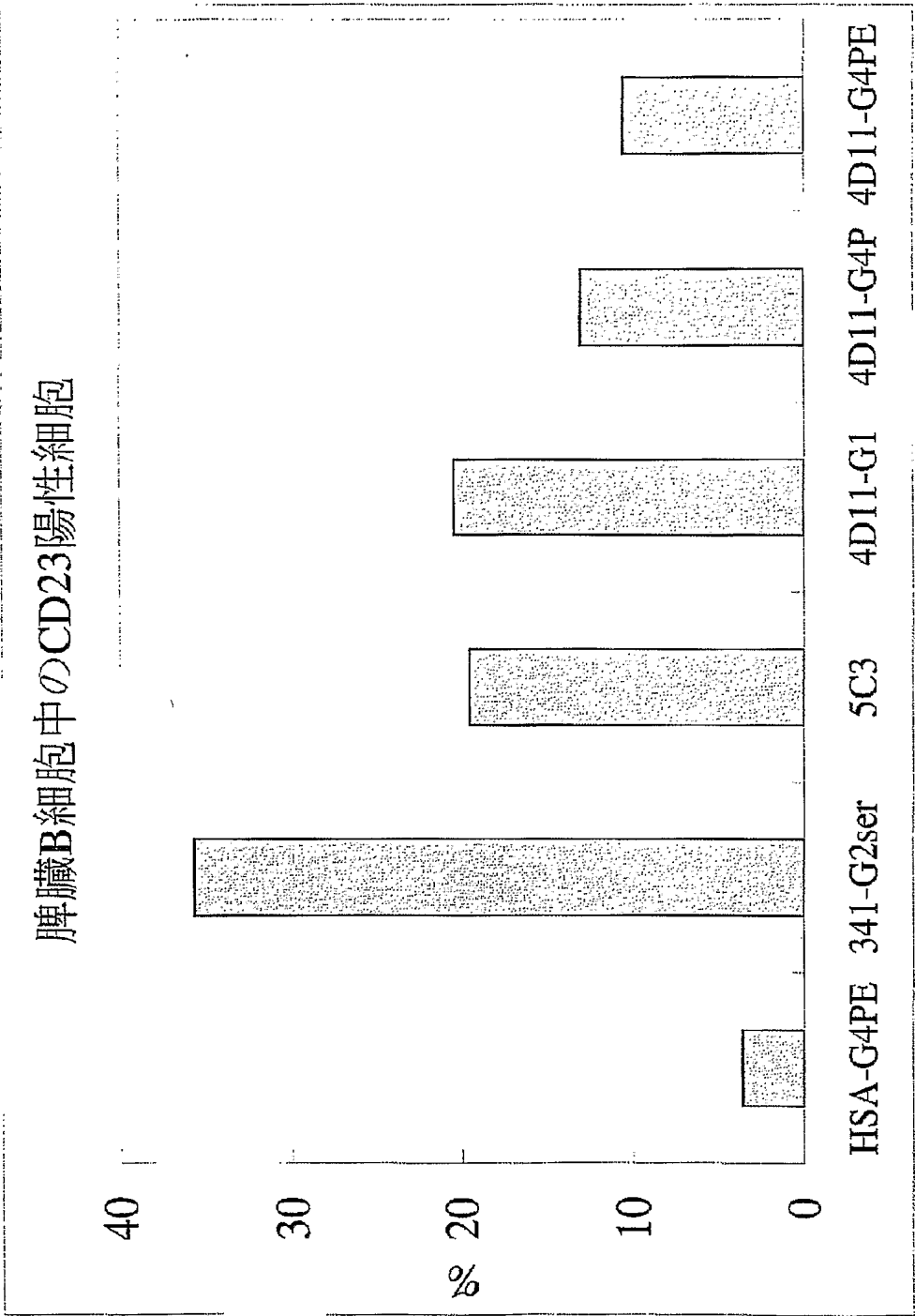
【図 10】



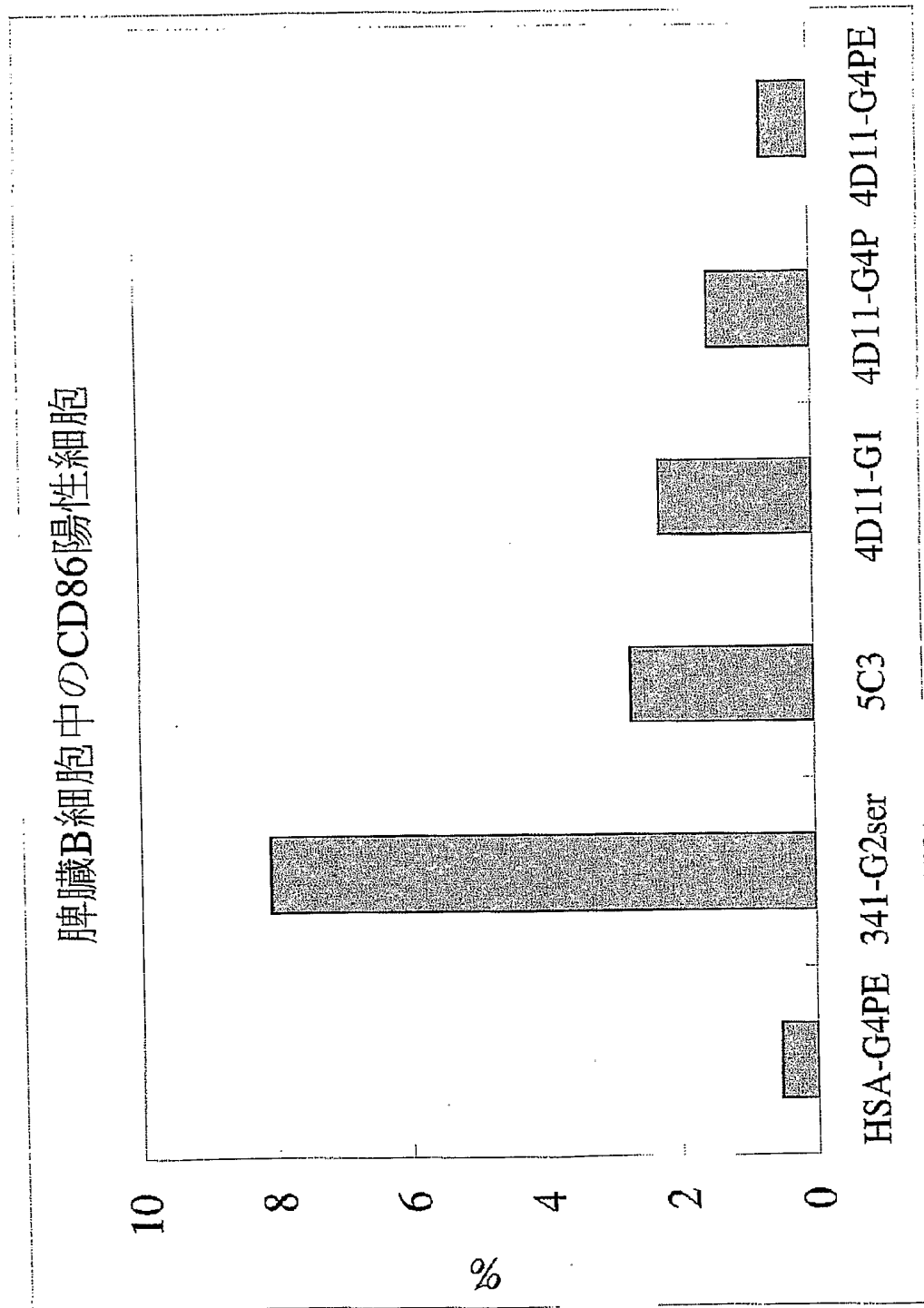
【図 11】



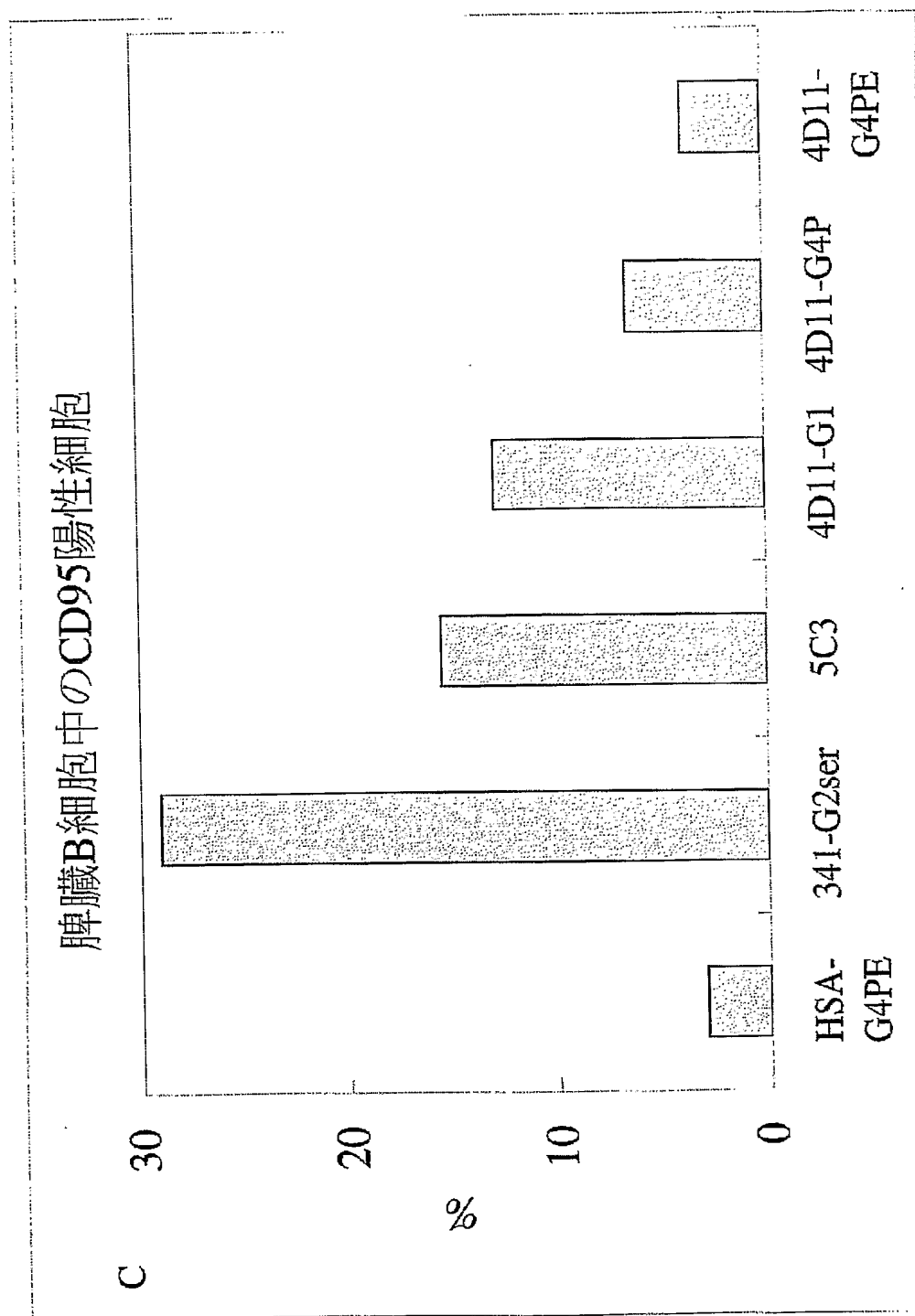
【図 12 A】



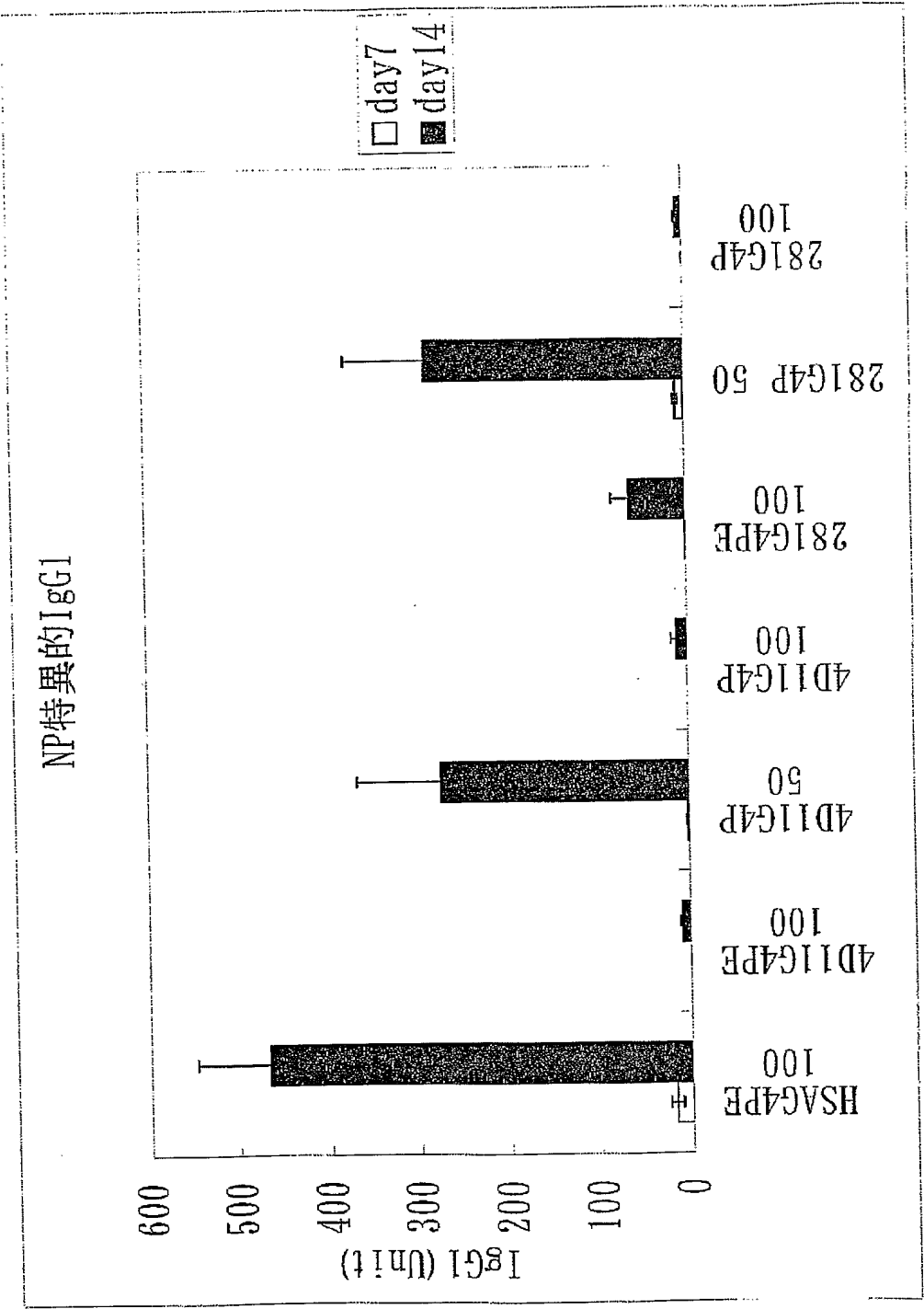
【図 12B】



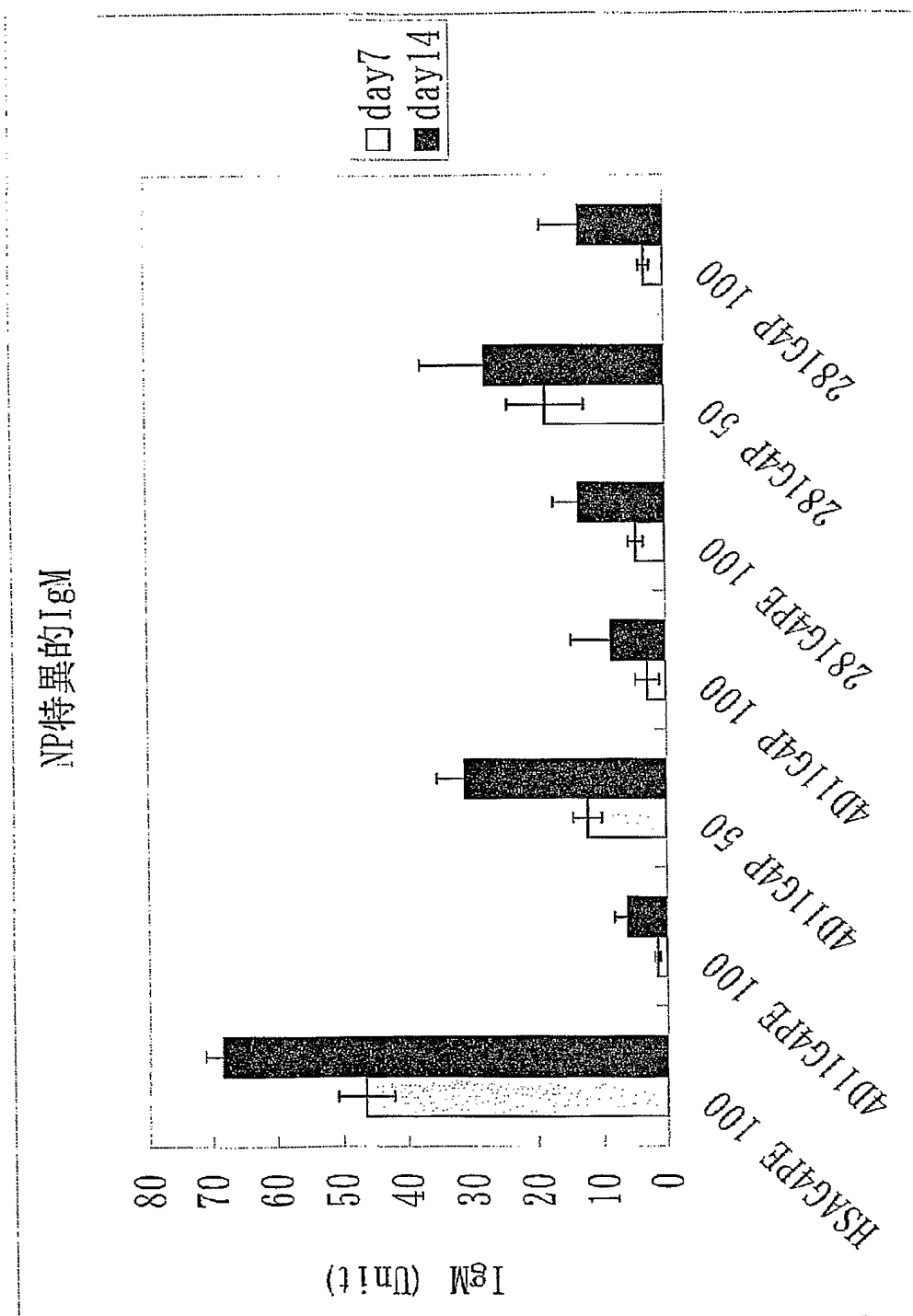
【図 12C】



【図13A】

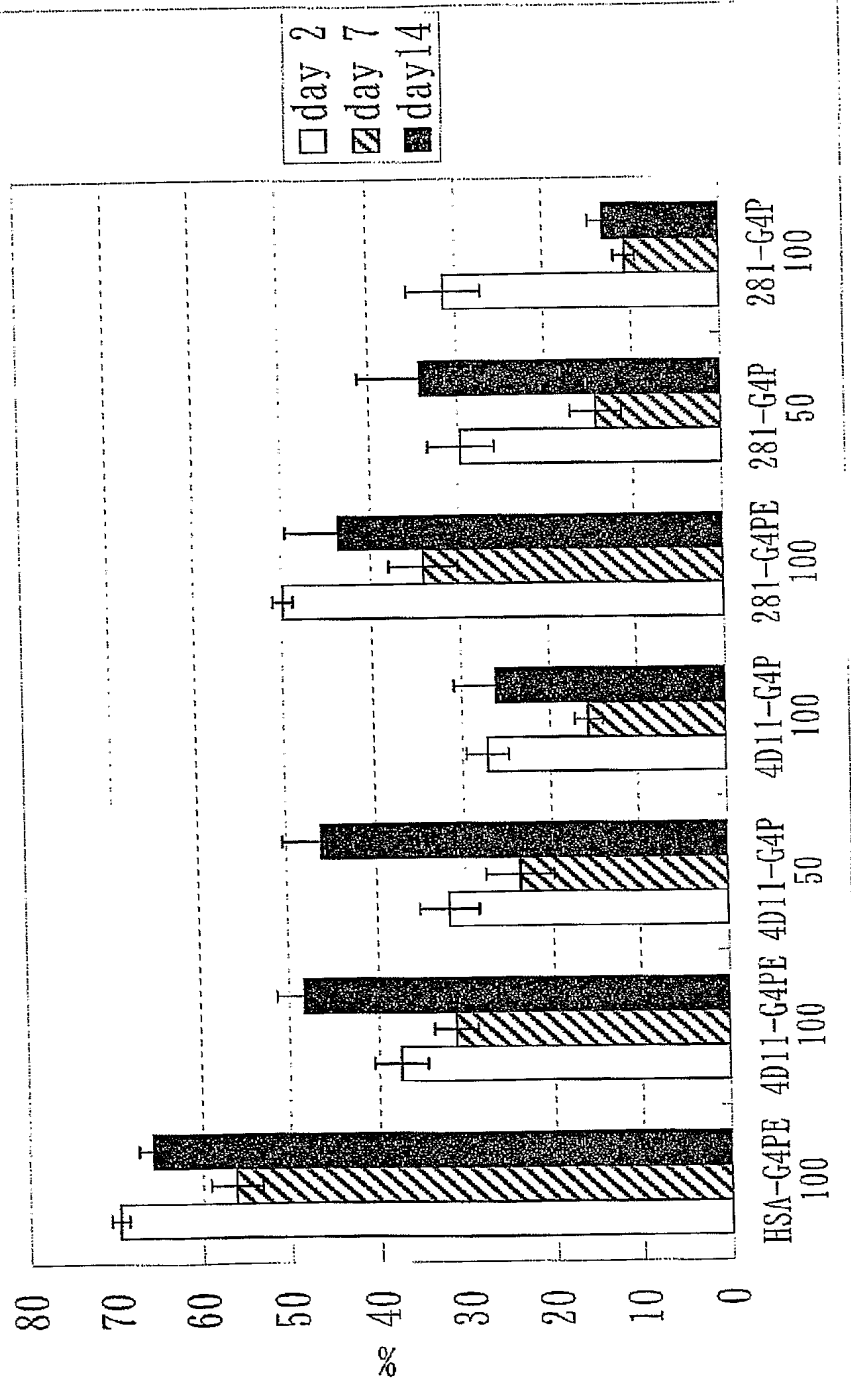


【図 13B】

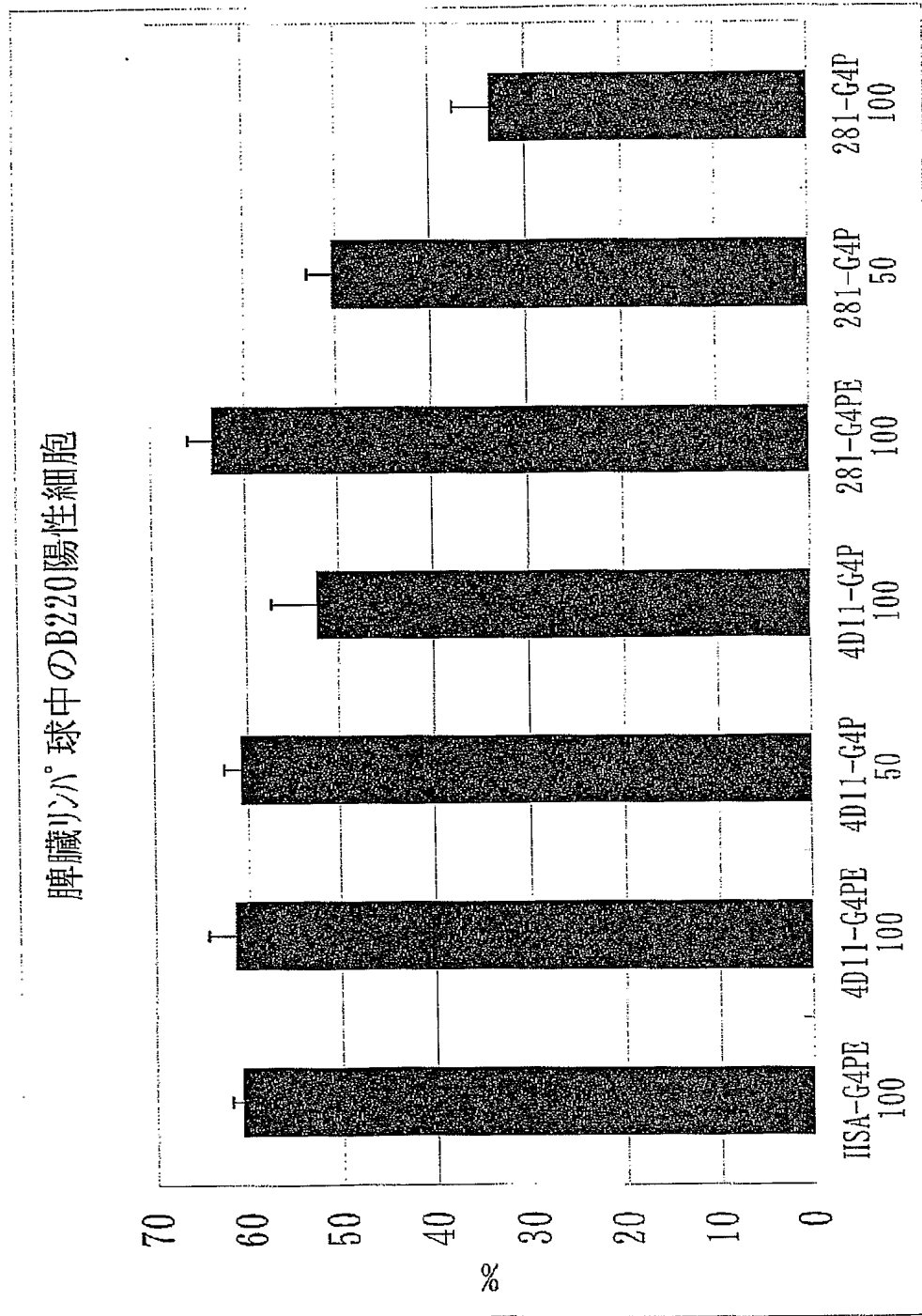


【図 14 A】

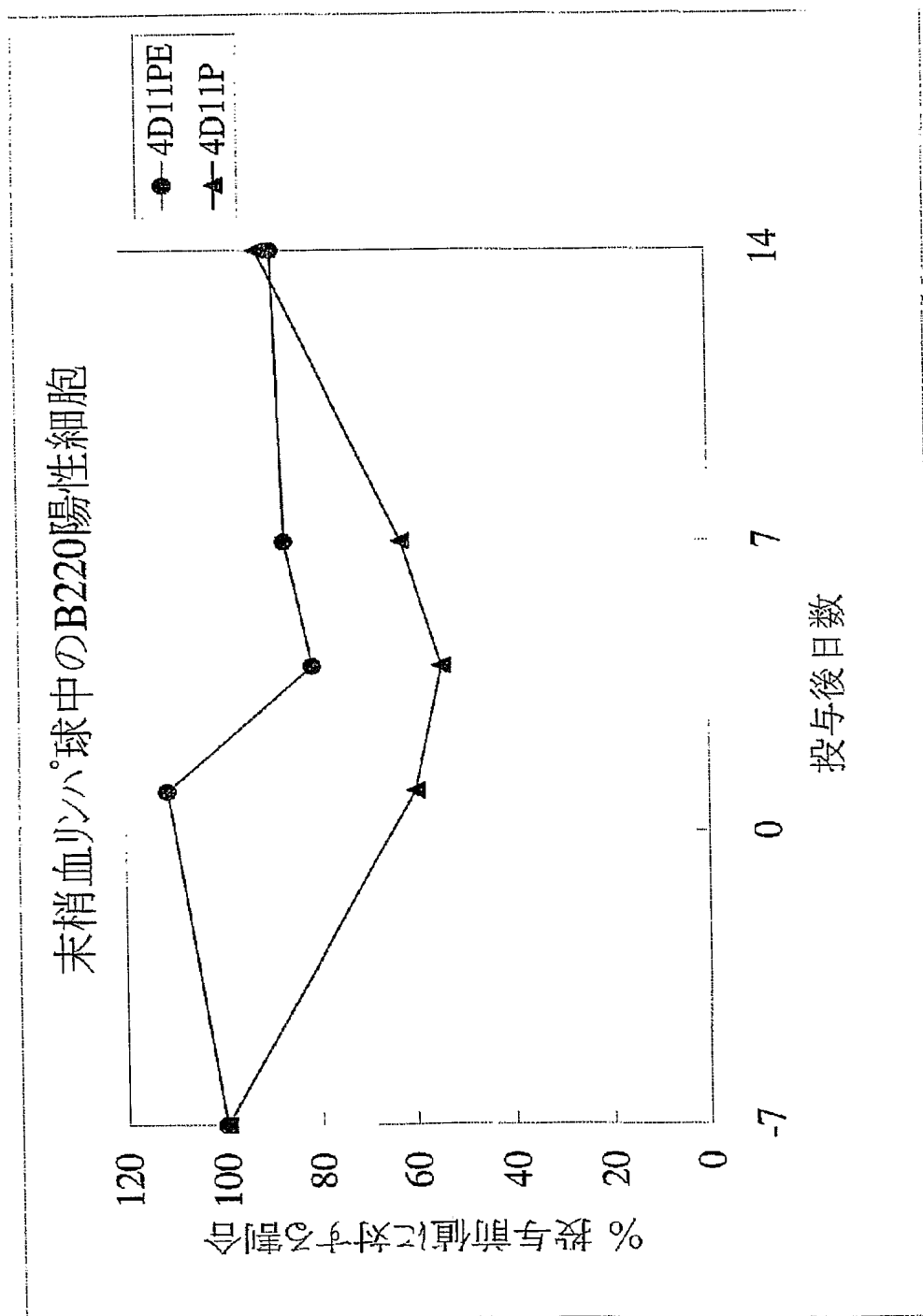
末梢血リンパ球中のB220陽性細胞



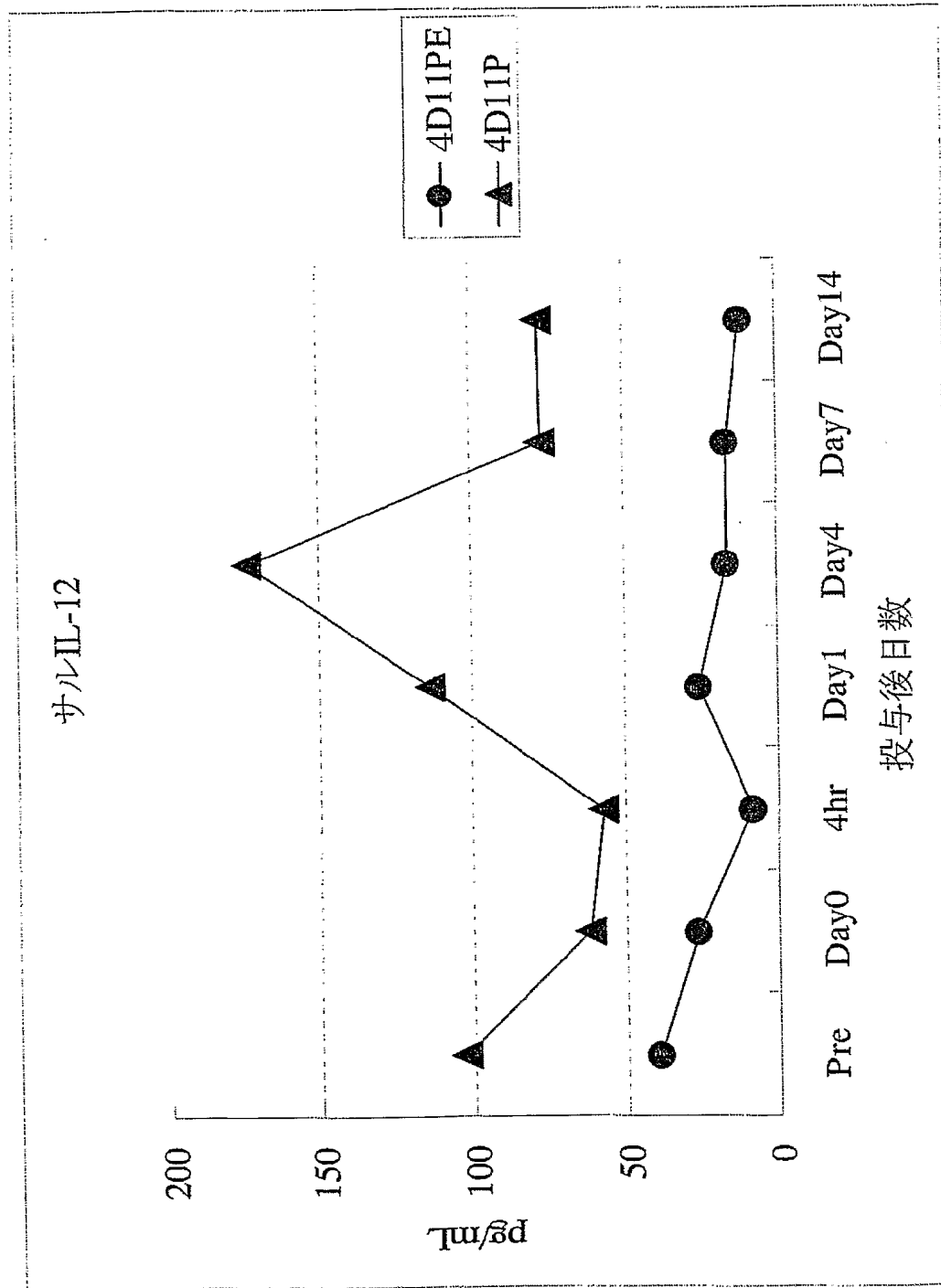
【図 14B】



【図 15】



【図 16】



【図 17】

雄力ニクイザルにおける遅延型過敏症

群 (mg/kg)	処置				平均スコア*	
	テタス毒素 感作	背部皮内	筋肉内	腹部皮内 チャレンジ	24時間**	48時間**
対照	10 μ L/ 部位 x 12 部位	0.6 mL/ 個体	0 Lf/mL	0 Lf/mL	0.00	0.00
				1 Lf/mL	1.67	1.00
				3 Lf/mL	3.00	2.67
				10 Lf/mL	3.33	3.00
4D11 1 (mg/kg)	10 μ L/ 部位 x 12 部位	0.6 mL/ 個体	0 Lf/mL	0 Lf/mL	0.00	0.00
				1 Lf/mL	0.67	0.67
				3 Lf/mL	1.00	0.67
				10 Lf/mL	1.00	1.00
4D11 10 (mg/kg)	10 μ L/ 部位 x 12 部位	0.6 mL/ 個体	0 Lf/mL	0 Lf/mL	0.00	0.00
				1 Lf/mL	0.00	0.00
				3 Lf/mL	0.67	0.33
				10 Lf/mL	1.00	0.67

備考

*: 反応スコア
 紅斑および痂皮の形成
 紅斑なし
 非常に軽度な紅斑 (かろうじて認識できる)
 はっきりした紅斑
 中程度の紅斑
 高度紅斑からわずかな痂皮 (深部損傷) まで
 **: チャレンジ後時間

浮腫の形成
 浮腫なし
 非常に軽度な浮腫 (かろうじて認識できる)
 軽度浮腫 (はっきりした膨隆による明確な縁が識別できる)
 中等度浮腫 (約1mmの膨隆)
 高度浮腫 (1mm以上の膨隆と暴露範囲を超えた広がり)

0
: 1
: 2
: 3
: 4

0
: 1
: 2
: 3
: 4

【図 18】

抗デタヌス毒素 IgG 抗体力価

(最大陽性希釈倍率)

群	動物 No.	pre	初回投与後の日数							
			4	7	11	14	18	21	23	
対照	1	0	200	0	12800	102400	204800	204800	204800	204800
	2	0	0	0	6400	25600	51200	51200	51200	51200
	3	0	0	0	6400	12800	25600	25600	25600	25600
	Mean	0	67	0	8533	46933	93867	93867	93867	93867
	S.D.	0	115	0	3695	48460	96920	96920	96920	96920
1 (mg/kg)	4	0	0	0	200	1600	12800	12800	12800	12800
	5	0	0	0	200	400	6400	6400	6400	6400
	6	0	0	0	400	3200	6400	6400	6400	6400
	Mean	0	0	0	267	1733	8533	8533	8533	8533
	S.D.	0	0	0	115	1405	3695	3695	3695	3695
10 (mg/kg)	7	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	8	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	9	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Mean	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	S.D.	0	0	0	0	0	0	0	0	0

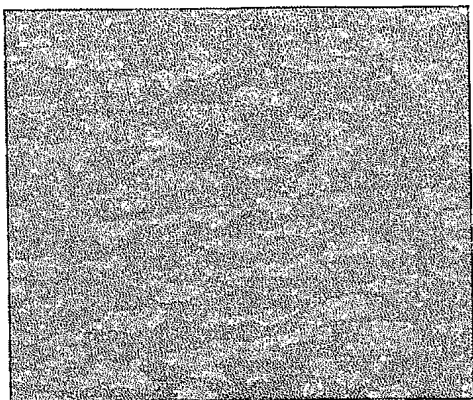
【図 19】

抗アタヌス毒素 IgM 抗体力価

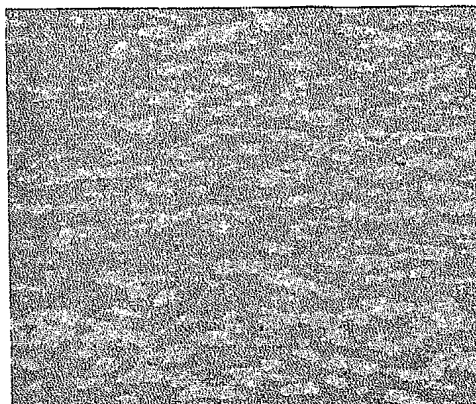
群	動物 No.	prec	初回投与後日数							(最大陽性希釈倍率)			
			4	7	11	14	18	21	23				
対照	1	0	0	0	3200	6400	6400	6400	6400				
	2	0	0	0	1600	1600	1600	1600	1600				
	3	0	0	0	800	1600	1600	1600	1600				
	Mean	0	0	0	1867	3200	3200	3200	3200				
	S.D.	0	0	0	1222	2771	2771	2771	2771				
1 (mg/kg)	4	0	0	0	0	0	0	400	0	0			
	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
	6	0	0	0	0	0	800	800	800	800			
	Mean	0	0	0	0	0	267	400	267	267			
	S.D.	0	0	0	0	0	462	400	462	462			
10 (mg/kg)	7	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
	8	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
	9	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
	Mean	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
	S.D.	0	0	0	0	0	0	0	0	0			

【図 2 0 A】

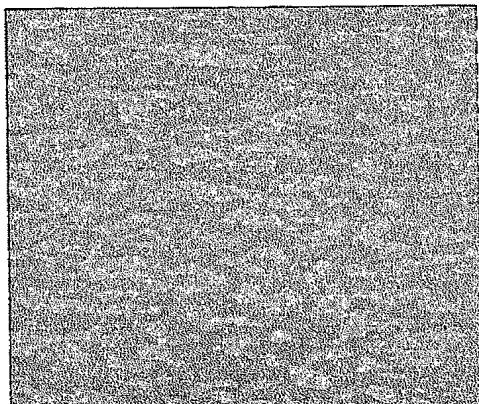
ヒトコントロールIgG4



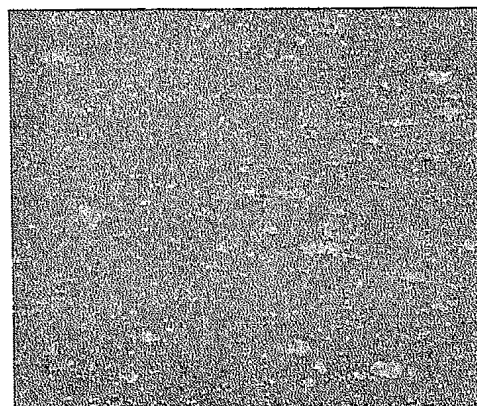
抗CD40抗体 (4D11)



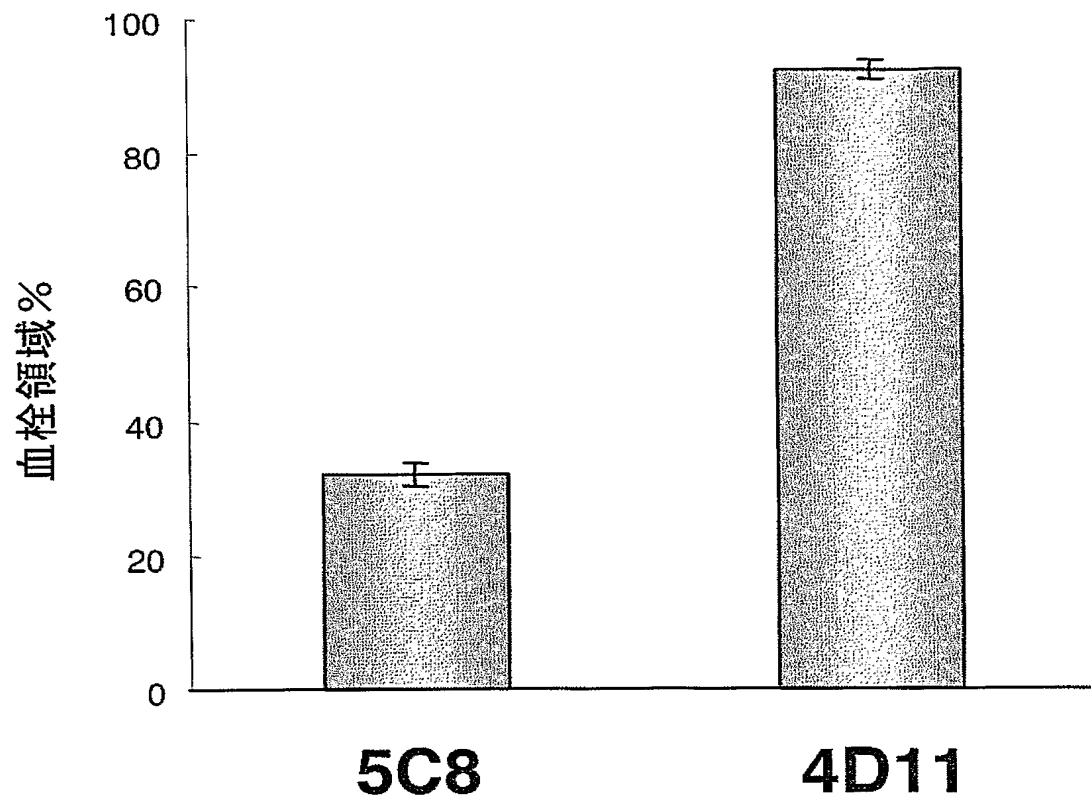
マウスコントロールIgG2



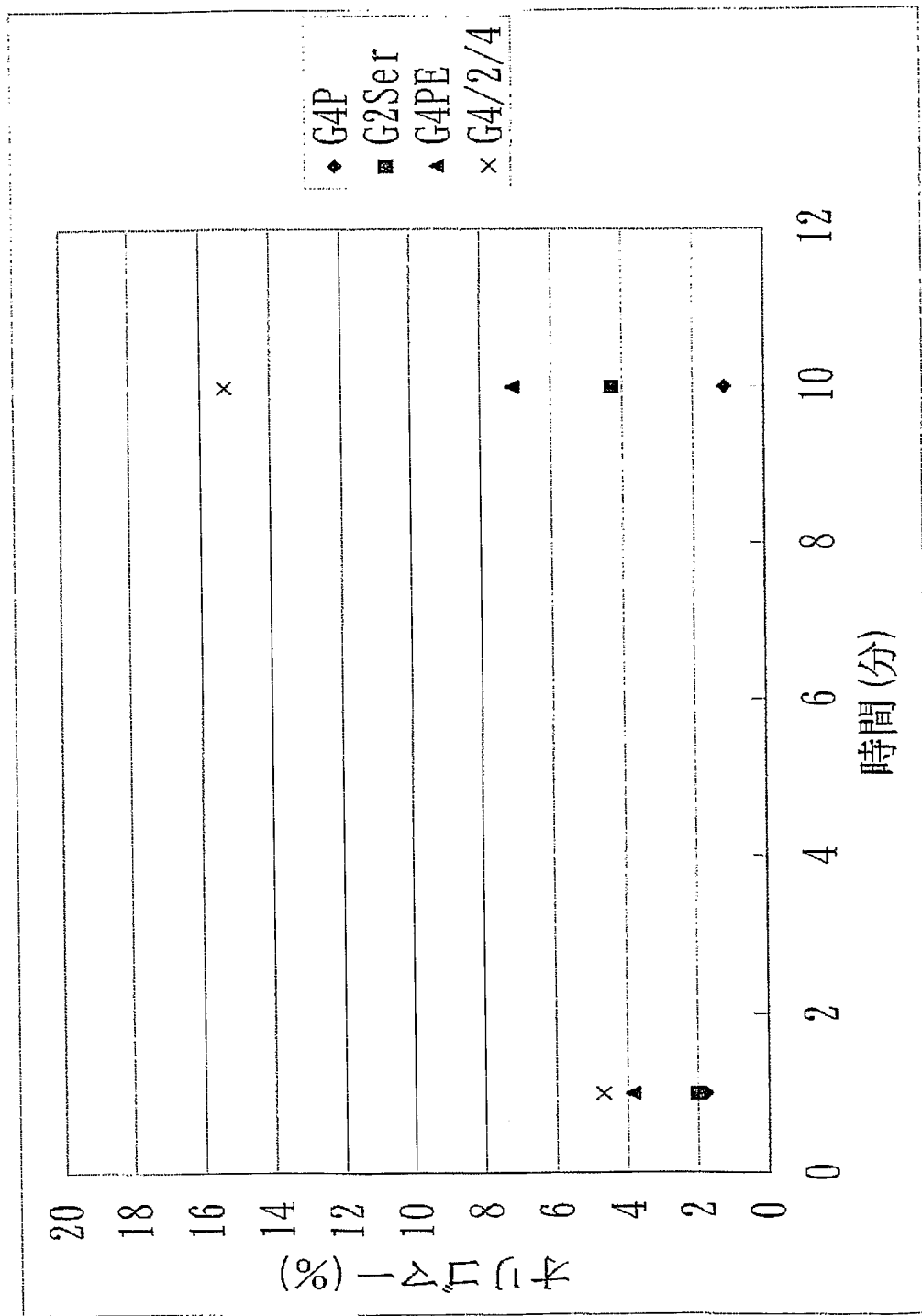
抗CD40L抗体 (5C8)



【図 20B】



【図 21】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 治療効果が期待できる抗CD40抗体について、医薬品としての最適化の図られたADCC活性およびCDC活性が低減された変異体の提供。

【解決手段】 少なくともヒンジ領域がヒトIgG2に由来するヒンジ領域であり、定常領域にADCCおよび／またはCDC活性の低減をもたらす1アミノ酸以上の変異および／または置換を含む、アゴニスティック抗CD40モノクローナル抗体の変異体および定常領域にADCCおよび／またはCDC活性の低減をもたらす1以上の変異もしくは置換を含むアンタゴニスティック抗CD40抗体の変異体。

【選択図】 なし

特願 2 0 0 3 - 4 3 1 4 0 8

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [0 0 0 2 5 3 5 0 3]

1. 変更年月日	1 9 9 5 年 6 月 1 4 日
[変更理由]	住所変更
住 所	東京都中央区新川二丁目 1 0 番 1 号
氏 名	麒麟麦酒株式会社